

## 明細書

## ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物

## 技術分野

本発明は、ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含む医薬に関する。

## 背景技術

シアル酸を有する糖脂質の一種であるガングリオシドは、動物の細胞膜を構成しており、親水性側鎖である糖鎖と、疎水性側鎖であるスフィンゴシンおよび脂肪酸とから構成される分子である。ガングリオシドの種類と発現量は、細胞種、臓器種、動物種等によって異なる。さらに細胞が癌化する過程において、ガングリオシドの発現が量的および質的に変化することも知られている [Cancer Res., 45, 2405, (1985)]。

例えば、悪性度が高いといわれている神経外胚葉系腫瘍である神経芽細胞腫、肺小細胞癌およびメラノーマでは、正常細胞にはほとんど認められないガングリオシド GD2、GD3、GM2 等が発現していることが報告されており [Cancer Res., 45, 2405, (1985)、J. Exp. Med., 155, 1133, (1982)、J. Biol. Chem., 257, 12752, (1982)、Cancer Res., 47, 225, (1987)、Cancer Res., 47, 1098, (1987)、Cancer Res., 45, 2642, (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 5392, (1983)]、このような腫瘍細胞に特異的なガングリオシドに対する抗体はヒトの様々な癌の治療に有用であると考えられている。

一般にヒト以外の動物の抗体をヒトに投与すると、異物として認識され、副作用を惹起することや [J. Clin. Oncol., 2, 881, (1984)、Blood, 65, 1349, (1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 932, (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 1242, (1985)]、抗体の体内からの消失を速めることにより [Blood, 65, 1349, (1985)、J. Nucl. Med., 26, 1011,

(1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 937, (1988)]、抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている [J. Immunol., 135, 1530, (1985)、Cancer Res., 46, 6489, (1986)]。

これらの問題点を解決するために遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体をヒト型キメラ抗体、あるいはヒト型 CDR 移植抗体などのヒト化抗体にすることが試みられている [Nature, 321, 522, (1986)]。ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、免疫原性が低下し [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 4220, (1989)]、治療効果が延長することが報告されている [Cancer Res., 56, 1118, (1996)、Immunol., 85, 668, (1995)]。

ガングリオシド GM2 に対するヒト化抗体は、ヒトメラノーマの治療に有用であることが示されている [Lancet, 1, 786, (1989)]。ガングリオシド GM2 に特異的に反応し、抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC 活性と記す）や補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC 活性と記す）等の細胞傷害活性を有するヒト化抗体としては、ヒト IgG クラスのヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体が取得されている [WO00/61739、WO02/31140]。

また、ヒト化抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。例えば、エフェクター機能の高いヒト化抗体を作製することができる [Cancer Res., 56, 1118, (1996)]。

近年、Rituxan による非ホジキン白血病患者の治療、Herceptin による乳癌患者の治療において、該抗体医薬が患者のエフェクター細胞に強い ADCC 活性を惹起した場合には、より高い治療効果が得られている (Blood, 99, 754, 2002; J. Clin. Oncol., 21, 3940, 2003; Clin. Cancer Res., 10, 5650, 2004)。

ヒト IgG1 サブクラスの抗体は、その Fc 領域および抗体レセプター（以下、Fc $\gamma$ R と表記する）あるいは各種補体成分を介して、ADCC 活性および CDC 活性を発現する。抗体と Fc $\gamma$ R との結合においては、抗体のヒンジ領域及び C 領域の第 2 番目のドメイン（以下、C $\gamma$ 2 ドメインと表記する）に結合している糖鎖の重要性が示唆されている [Chem. Immunol., 65, 88, (1997)]。

抗体 IgG 分子の Fc 領域に結合している N-グリコシド結合複合型糖鎖の非還元末端へのガラクトースの付加、および還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関しては多様性があることが知られており [Biochemistry, 36, 130, (1997)]、特に糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加により、抗体の ADCC 活性が大きく低下す

ることが報告されている [W000/61739、J. Biol. Chem., 278, 3466, (2003)]。

一般に、医薬品として利用される抗体組成物の多くは、遺伝子組換え技術を用いて作製され、動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞などを宿主細胞として製造されているが、発現させた抗体組成物の糖鎖構造は宿主細胞によって異なる。従って、最適な薬理活性が発揮できるような糖鎖が付加されている抗体組成物を適切に調製し提供することが質の高い医療を患者へ提供する上で欠かせない。

抗体生産細胞内の  $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ (FUT8)、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (FX) の活性を低下または欠失することにより、Fc 領域を有する抗体分子からなる組成物中で、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を増加させることができる [W002/31140]。

#### 発明の開示

本発明の目的は、ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬等を提供することにある。本発明の抗ガングリオシド GM2 抗体組成物は高い細胞傷害活性を有するため、ガングリオシド GM2 を発現した細胞を患者の体内から減少させる治療に有用である。高い細胞傷害活性を有する抗体を治療に用いることにより、化学療法、放射性同位元素標識体などと併用が不要となることから患者への副作用を軽減させることが期待される。また、患者への治療薬の投与量を減少させることで患者への負担の軽減などが期待される。

#### 課題を解決するための手段

本発明は、以下の (1) ~ (48) に関する。

(1) ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有

する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物。

(2) N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合していない糖鎖である、(1)に記載の抗体組成物。

(3) ガングリオシド GM2 発現細胞に特異的に結合する(1)または(2)に記載の抗体組成物。

(4) ガングリオシド GM2 発現細胞に対し細胞傷害活性を示す(1)～(3)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(5) ガングリオシド GM2 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す(1)～(4)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(6) 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性である(4)または(5)に記載の抗体組成物。

(7) 細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性である(4)または(5)に記載の抗体組成物。

(8) それぞれ配列番号 14、15 および 16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、(1)～(7)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(9) それぞれ配列番号 17、18 および 19 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、(1)～(7)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(10) それぞれ配列番号 14、15 および 16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 17、18 および 19 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、(1)～(9)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(11) 遺伝子組換え抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型 CDR 移植抗体である(1)～(10)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(12) ヒト型キメラ抗体がガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体



の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、  
(11) に記載の抗体組成物。

(13) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 20 で示されるアミノ酸配列を含む (12) に記載の抗体組成物。

(14) 抗体分子の軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む (12) に記載の抗体組成物。

(15) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 20 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む (12) ~ (14) のいずれか 1 項に記載のヒト型キメラ抗体組成物。

(16) ヒト型 CDR 移植抗体がガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、  
(11) に記載の抗体組成物。

(17) ガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR) を含む、(16) に記載の抗体組成物。

(18) ガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体の H 鎖定常領域 (C 領域) および L 鎖 C 領域を含む、(16) または (17) に記載の抗体組成物。

(19) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16) ~ (18) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(20) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16) ~ (18) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(21) 抗体分子の軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、

または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16) ~ (18) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(22) 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16) ~ (18) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(23) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16) ~ (19) または (21) に記載の抗体組成物。

(24) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16) ~ (18)、(20) または (21) に記載の抗体組成物。

(25) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16)～(18)、(20)または(22)のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(26) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、それぞれ配列番号 22、23、26、27、28、29 および 30 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、(16)～(20)、(23)～(25)のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(27) 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、それぞれ配列番号 24、25、31、32、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む(16)～(18)、(21)～(25)のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(28) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 22、23、26、27、28、29、30 で示されるから選ばれるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含み、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 24、25、31、32、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む(16)～(27)のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(29) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号 31 または 32 で示されるアミノ酸配列を含む(16)～(19)、(21)、(23)、(26)～(28)のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(30) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号 32 または 35 で示されるアミノ酸配列を含む(16)～(19)、(21)～(23)、(26)～(28)のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(31) ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる、(1) ~ (30) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を生産する形質転換体。

(32) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素を失活するようにゲノムが改変された細胞である、(31) に記載の形質転換体。

(33) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞である、(31) に記載の形質転換体。

(34) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) または GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) から選ばれる酵素である、(32) または (33) に記載の形質転換体。

(35) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(34) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(36) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) ~ (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(34) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

(37) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) および

(b)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(34)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号3で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号3で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(38) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a)~(c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(34)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

(39) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼである(32)または(33)に記載の形質転換体。

(40)  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)~(d)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(39)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号5で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号6で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号5で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号6で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(41)  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)~(f)からなる群から選ばれる蛋白質である、(39)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(c) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(4 2) 形質転換体が FERM BP-8470.である (4 1) に記載の形質転換体。

(4 3) 宿主細胞が、下記の(a)～(i)からなる群から選ばれる細胞である (3 1) ～ (4 2) のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

(4 4) (3 1) ～ (4 3) のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、(1) ～ (3 0) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物の製造方法。

(4 5) (4 4) に記載の製造方法により得られる、(1) ～ (3 2) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(4 6) (1) ～ (3 0) および (4 5) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分

として含有する医薬。

(47) (1)～(30) および (45) のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有するガングリオシド GM2 関連疾患の治療薬。

(48) ガングリオシド GM2 関連疾患が癌である (47) に記載の治療薬。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2003年10月9日に出願された日本国特許出願 2003-350168 号および 2004年4月26日に提出された日本国特許出願 2004-129431 号の優先権を主張するものであり、当該特許出願の明細書及び図面に記載される内容を包含する。

#### 発明を実施するための最良の形態

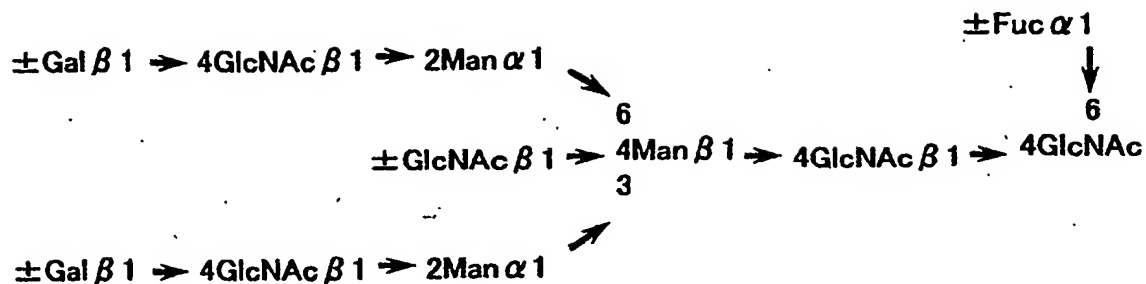
本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物としては、該 N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖である抗体組成物があげられる。

抗体分子には Fc 領域があり、それらの領域には N-グリコシド結合糖鎖が結合する。従って、抗体 1 分子あたり 2 本の糖鎖が結合している。

N-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAc と表記する）の側鎖を並行して、1 ないしは複数本有し、更に Gal-GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセクティングの N-アセチルグルコサミンなどを有するコンプレックス型（複合型）糖鎖をあげることができる。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖としては、下記化学式 1 で示される。

## 化学式 1



本発明において、フコースが結合していない糖鎖としては、上記で示された化学式中、還元末端側の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合されていないものであればよく、非還元末端の糖鎖の構造はいかなるものでもよい。

したがって、本発明の抗体組成物としては、上記の糖鎖構造を有していれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。

本発明において、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないとは、実質的にフコースが結合していないことをいう。実質的にフコースが結合していない抗体組成物とは、具体的には、後述の 4 に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的に検出できない程度の抗体組成物である場合をいう。実質的に検出できない程度とは、測定の検出限界以下であることを意味する。糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない本発明の抗体組成物は、高い ADCC 活性を有する。

N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法 23—糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989)]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離



することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖を HPAED-PAD 法 [J. Liq. Chromatogr., 6, 1577 (1983)] によって分析することで決定することができる。

本発明の抗体組成物としては、ガングリオシド GM2 発現細胞に対し、細胞傷害活性を有する抗体組成物が好ましい。

ガングリオシド GM2 発現細胞としては、ガングリオシド GM2 が発現している細胞であればいかなるものでもよい。

細胞傷害活性としては、補体依存性細胞傷害活性(以下、CDC 活性と記す)あるいは抗体依存性細胞傷害活性(以下、ADCC 活性と記す)などがあげられる。

本発明のガングリオシド GM2 発現細胞に対し細胞傷害活性を有する抗体組成物は、該抗体組成物の有する細胞傷害活性によりガングリオシド GM2 発現細胞を傷害することにより、該細胞が関与する肺小細胞癌、メラノーマ、神経芽細胞腫などの疾患を治療できる。

本発明の抗体組成物は、ヒト型キメラ抗体組成物、ヒト型 CDR 移植抗体組成物およびヒト抗体組成物、ならびにそれらの抗体断片組成物を包含する。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL とヒト抗体の CH および CL とからなる抗体をいう。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体組成物は、ガングリオシド GM2 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

本発明のヒト型キメラ抗体組成物の製造に用いるヒト以外の動物の抗体としては、具体的には、特開平 4-311385 に記載のマウスモノクローナル抗体 KM690、マウスモノクローナル抗体 KM750 およびマウスモノクローナル抗体 KM796、Cancer Res., 46, 4116, (1986)に記載のモノクローナル抗体 MoAb5-3、Cancer Res., 48, 6154, (1988)に記載のモノクローナル抗体 MK1-16、モノクローナル抗体 MK2-34、J. Biol. Chem., 264, 12122, (1989)に記載のモノクローナル抗体 DMAb-1 などがあげられる。また、ヒト抗体ではあるが、IgM クラスである Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 79, 7629, (1982)に記載のモノクローナル抗体なども本発明のヒト型キメラ抗体組成物の製造に用いられる。

本発明において、ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合するヒト型キメラ抗体組成物としては、それぞれ配列番号 14、15 および 16 で示されるアミノ酸配列からなる VH の CDR1、CDR2、CDR3 および／またはそれぞれ配列番号 17、18 および 19 で示されるアミノ酸配列からなる VL の CDR1、CDR2、CDR3、を含む抗ガングリオシド GM2 キメラ抗体組成物、抗体の VH が配列番号 20 で示されるアミノ酸配列および／または VL が配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む抗ガングリオシド GM2 キメラ抗体組成物、抗体の VH が配列番号 20 で示されるアミノ酸配列およびヒト抗体の CH が hIgG1 サブクラスのアミノ酸配列からなり、抗体の VL が配列番号 21 で示されるアミノ酸配列およびヒト抗体の CL が  $\kappa$  クラスのアミノ酸配列からなる抗ガングリオシド GM2 キメラ抗体組成物などがあげられる。

本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合するヒト型キメラ抗体組成物が有するアミノ酸配列としては、具体的には、WO00/61739 に記載の KM966 が有するアミノ酸配列などがあげられる。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR をヒト抗体の VH および VL の適切な位置に移植した抗体を意味する。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物は、ガングリオシド GM2 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を任意のヒト抗体の VH および VL の FR に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の H 鎖 C 領域（以下、CH と表記する）および L 鎖 C 領域（以下、CL と表記する）をコードする DNA を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物の製造に用いるヒト以外の動物の抗体としては、具体的には、特開平 4-311385 に記載のマウスモノクローナル抗体 KM690、マウスモノクローナル抗体 KM750 およびマウスモノクローナル抗体 KM796、Cancer Res., 46, 4116, (1986)に記載

のモノクローナル抗体 MoAb5-3、Cancer Res., 48, 6154, (1988)に記載のモノクローナル抗体 MK1-16、モノクローナル抗体 MK2-34、J. Biol. Chem., 264, 12122, (1989)に記載のモノクローナル抗体 DMAb-1 などがあげられる。また、ヒト抗体ではあるが、IgMクラスである Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 79, 7629, (1982)に記載のモノクローナル抗体なども本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物の製造に用いられる。

ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のアミノ酸配列であれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank などのデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列、またはヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) などがあげられる。

本発明において、ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン (以下、hIg と表記する) に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、さらに hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、hIg に属すればいずれのものでもよく、 $\kappa$  クラスあるいは  $\lambda$  クラスのものを用いることができる。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物としては、ガングリオシド GM2 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物があげられるが、好ましくは、それぞれ配列番号 14、15、16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VH の CDR1、CDR2、CDR3 および/またはそれぞれ配列番号 17、18、19 で示されるアミノ酸配列からなる VL の CDR1、CDR2、CDR3 を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物または該抗体断片組成物などがあげられる。

これらのヒト型 CDR 移植抗体組成物なかでも、抗体の VH が配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH が配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VL が配

列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VL が配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物が好ましく、抗体の VH が配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の VL が配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH が配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の VL が配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH が配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の VL が配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、

77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、がより好ましい。

具体的には、抗体の VH がそれぞれ配列番号 22、23、26、27、28、29、30 で示されるアミノ酸配列から選ばれる 1 つのアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、VL がそれぞれ配列番号 24、25、31、32、33、34、35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH がそれぞれ配列番号 22、23、26、27、28、29、30 で示されるアミノ酸配列から選ばれる 1 つのアミノ酸配列を含み、かつ、VL がそれぞれ配列番号 24、25、31、32、33、34、35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、より具体的には、VH が配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VL が配列番号 31 または 32 で示されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、VH が配列番号 22 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VL が配列番号 32 または 35 で示されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物があげられる。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物としては、VH が配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VL が配列番号 31 で示されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、VH が配列番号 22 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VL が配列番号 32 で示されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物が最も好ましい。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物が有するアミノ酸配列の具体例としては、それぞれ特開平 10-257893 に記載の形質転換株 KM8966 (FERM BP-5105) が生産する KM8966、形質転換株 KM8967 (FERM BP-5106) が生産する KM8967、形質転換株 KM8969 (FERM BP-5527) が生産する KM8969、形質転換株 KM8970 (FERM BP-5528) が生産する KM8970 が有するアミノ酸配列などがあげられる。

これらのアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつガングリオシド GM2 と特異的に結合する抗体または抗体断片も本発明の抗体組成物に包含される。

本発明の抗体組成物のアミノ酸配列において欠失、置換、挿入および/または付加されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、モレキュラー・クローニング 第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315

(1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

本発明の抗体組成物のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

本発明の遺伝子組換え抗体断片組成物は、ガングリオシド GM2 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体の抗体断片からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体 Fc 領域の一

部または全部を含んでいる抗体断片組成物である。

本発明の抗体断片組成物としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、diabody、dsFv および CDR を含むペプチドなどの抗体断片組成物があげられるが、該抗体断片組成物に抗体の Fc 領域の一部または全部を含まない場合は、該抗体断片と、N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する抗体 Fc 領域の一部または全部との融合蛋白質とすればよいと融合させるか、または該 Fc 領域の一部または全部を含む、蛋白質との融合蛋白質組成物とすればよい。

Fab は、IgG を蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H 鎖の 224 番目のアミノ酸残基で切断される）、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体の Fab をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab を製造することができる。

F(ab')<sub>2</sub> は、IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H 鎖の 234 番目のアミノ酸残基で切断される）、Fab がヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約 10 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の F(ab')<sub>2</sub> は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記の Fab' をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab' は、上記 F(ab')<sub>2</sub> のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab' は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する F(ab')<sub>2</sub> 組成物を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体の Fab' 断片をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab' を製造することができる。

scFv は、1 本の VH と 1 本の VL とを適当なペプチドリンカー（以下、P と表記する）を用いて連結した、VH-P-VL ないしは VL-P-VH ポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片

である。

本発明の scFv は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFv を製造することができる。

diabody は、scFv が二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

本発明の diabody は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を P のアミノ酸配列の長さが 8 残基以下となるように構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、diabody を製造することができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明の dsFv は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFv を製造することができる。

CDR を含むペプチドは、VH または VL の CDR の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR を含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明の CDR を含むペプチドは、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL の CDR をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDR を含むペプチドを製造することができる。



また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の形質転換体としては、ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる形質転換体であって、本発明の抗体組成物を生産する形質転換体であればいかなる形質転換体でも包含される。具体的な例としては、ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を以下の(a)または(b)などの宿主細胞に導入して得られる形質転換体があげられる。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が失活するようにゲノムが改変された細胞；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活するようにゲノムが改変された細胞。

上述において、酵素が失活するようにゲノムが改変されたとは、該酵素の発現を欠失させるように該酵素をコードする遺伝子の発現調節領域に変異を導入したり、または該酵素を失活させるように該酵素をコードする遺伝子のアミノ酸配列に変異を導入することをいう。変異を導入するとは、ゲノム上の塩基配列を欠失、置換、挿入および／または付加させるといった塩基配列の改変を行うことをいう。このように改変されたゲノム遺伝子の発現または活性が完全に抑制されることをゲノム遺伝子がノックアウトされるという。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) などがあげられる。

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA；などがあげられる。

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿

入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；  
などがあげられる。

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

(a) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA；  
などがあげられる。

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

(a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；  
などがあげられる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼがあげられる。

本発明において、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)、(b)、(c)または(d)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA

(c) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA

(d) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA または、

(e) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(f) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(g) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(h) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(i) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(j) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

等があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 1 または 3 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 1 または 3 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA などがあげられる。

$\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA とは、例えば配列番号 1、3、5 または 6 で表される塩基配列からなる DNA などの DNA またはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション

ン法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7～1M の塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズ可能な DNA として具体的には、配列番号 1、3、5 または 6 で表される塩基配列と少なくとも 60%以上の相同性を有する DNA、好ましくは 70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%以上、最も好ましくは 98%以上の相同性を有する DNA をあげることができる。

本発明において、配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質、または配列番号 7 または 8 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号 1、3、5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA に部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個である。

また、本発明において配列番号 2、4、7 または 8 であらわされるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性、または  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質としては、具体的には、それぞれ配列番号 2、4、7 または 8 で表されるアミノ酸配列と BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] や FASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも 80% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 97% 以上、最も好ましくは 99% 以上の相同性を有する蛋白質などをあげることができる。

また、本発明に用いられる宿主細胞、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失した宿主細胞を取得する方法としては、目的とする酵素を失活させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素を失活させる手法としては、

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
- (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法などがあげられる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等を挙げることができる。

レクチンに耐性な細胞とは、レクチンを有効濃度与えたときにも、生育が阻害されない細

胞を言う。有効濃度とは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞（以下、親株とも称す）が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞が成育できない濃度と同濃度、より好ましくは2～5倍、さらに好ましくは10倍、最も好ましくは20倍以上である。

生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよく、通常のレクチンの有効濃度は10 $\mu$ g/mL～10mg/mL、好ましくは0.5mg/mL～2mg/mLである。

本発明の抗体組成物を生産させる宿主細胞としては、本発明の抗体組成物を発現できる上記宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞としては、後述1に記載のものがあげられ、特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞、ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞、マウスミエローマ細胞株NS0細胞、マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。

本発明の形質転換体としては、具体的には、本発明の抗ガングリオシドGM2抗体の遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞株CHO/DG44細胞由来の形質転換株Ms705/GM2があげられる。なお、CHO細胞株CHO/DG44細胞由来の形質転換株Ms705/GM2は、平成15年9月9日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）にFERM BP-8470として寄託されている。

以下に、本発明の抗体組成物を生産する細胞の作製方法、本発明の抗体組成物の製造方法および本発明の抗体組成物の分析方法ならびに利用方法について説明する。

#### 1. 本発明の抗体組成物を生産する細胞の作製

本発明の抗体組成物を生産する細胞（以下、本発明の細胞と称する）は、以下に述べる手法により、本発明の抗体組成物を生産するために用いる宿主細胞を作製し、該宿主細胞に後述2に記載の方法により、抗ガングリオシドGM2抗体をコードする遺伝子を導入することにより、作製することができる。

##### （1）酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の抗体組成物を生産する細胞（以下、本発明の細胞と称す）の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド

結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ（以下、GMD と表記する）、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ（以下、Fx と表記する）などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNA または RNA を含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RNA-DNA オリゴヌクレオチド法（以下、RDO 法と表記する）、RNA インターフェアレンス法（以下、RNAi 法と表記する）、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

(a) アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の細胞を作製するための宿主細胞の作製

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素遺伝子を標的とし、細胞工学、12, 239 (1993)、BIO/TECHNOLOGY, 17, 1097 (1999)、Hum. Mol. Genet., 5, 1083 (1995)、細胞工学、13, 255 (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 1886 (1999)等に記載されたアンチセンス法またはリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA あるいはゲノム DNA を調製する。

調製した cDNA あるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの

1 位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA 部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムを設計する。

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製した DNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の抗体組成物を作製のために用いる宿主細胞を得ることもできる。

本発明の抗体組成物を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能であるか、ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述 2 に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法があげられる。



### 形質転換体を選択する方法

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活した細胞を選択する方法としては、文献 [新生化学実験講座 3—糖質 I, 糖蛋白質 (東京化学同人) 日本生化学会編 (1988)]、文献 [細胞工学, 別冊, 実験プロトコルシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコル, 糖蛋白質・糖脂質・プロテオグリカン (秀潤社製) 谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修 (1996)]、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) 等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などを用いて、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法があげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子の mRNA 量を測定するノーザン解析や RT-PCR 法等があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA を調製する方法としては、例えば、下記に記載の方法があげられる。

### cDNA の調製方法

各種宿主細胞の組織又は細胞から全 RNA 又は mRNA を調製する。

調製した全 RNA 又は mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製した

cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNA ライブラリーをスクリーニングし、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA を取得することができる。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞の mRNA は市販のもの(例えば Clontech 社)を用いてもよいし、以下のようにしてヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から調製してもよい。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

また、全 RNA から poly(A)+ RNA として mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] などがあげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社) などの市販のキットを用いることにより mRNA を調製することができる。

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞 mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。cDNA ライブラリー作製法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、A Laboratory Manual, 2 nd Ed. (1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えば SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies 社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE 社)を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用でき

る。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE 社、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、 $\lambda$ ZAP II (STRATAGENE 社)、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11 [DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 $\lambda$ TriplEx (Clontech 社)、 $\lambda$ ExCell (Pharmacia 社)、pT7T318U (Pharmacia 社)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] および pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

cDNA ライブラリーを作製するための宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [STRATAGENE 社、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] および Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーは、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長 cDNA の割合を下げて、完全長 cDNA を効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [Gene, 138, 171 (1994)、Gene, 200, 149 (1997)、蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNA クローニング(羊土社)(1996); 遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社)(1994)] を用いて調製して以下の解析に用いてもよい。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の 5' 末端および 3' 末端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] を用いて DNA の増幅を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

取得した遺伝子断片が細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$

結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA であることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片をプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション [Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] 等を用いて、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の DNA を取得することができる。

また、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを使用し、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法を用いて増幅することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA の塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

決定した cDNA の塩基配列をもとに、BLAST 等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、取得した DNA がデー

データベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 1 または 3 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 5 または 6 に記載の塩基配列があげられる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用した DNA 合成機 model 392 (Perkin Elmer 社製) 等の DNA 合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を取得することもできる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

#### ゲノム DNA の調製方法

ゲノム DNA を調製する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノム DNA ライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems 社) や Universal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH 社) などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結

合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に關与する酵素をコードする DNA の塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A.; 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

決定したゲノム DNA の塩基配列をもとに、BLAST<sup>®</sup>等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、取得した DNA がデータベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に關与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に關与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用した DNA 合成機 model 392 (Perkin Elmer 社製) 等の DNA 合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に關与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に關与する酵素のゲノム DNA を取得することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に關与する酵素のゲノム DNA の塩基配列としては、例えば配列番号 9、10、11 および 12 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に關与する酵素のゲノム DNA の塩基配列としては、例えば配列番号 13 に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に關与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に關与する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、公知の方法または DNA 合成機により調製することができる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA およびゲノム DNA の塩基配列のうち、連続した 5~150 塩基、好ましくは 5~60 塩基、より好ましくは 10~40 塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成して調製することができる。

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴ RNA および該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N3'-P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C-5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

#### (b) 相同組換え法による本発明の抗体組成物を作製するための宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用いて染色体を改変することによって作製すること

ができる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) (以下、「ES 細胞を用いた変異マウスの作製」と略す) 等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する。

ゲノム DNA の塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子 (例えば、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子) を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、染色体上の標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、上記 1 の (1) の (a) に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 9、10、11 および 12 に記載の塩基配列があげられる。



上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 13 に記載の塩基配列があげられる。

染色体上の標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、置換型、挿入型いずれでも用いることができる。

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述 3 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリ A 選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノム DNA に対するサザンハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] や PCR 法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] 等があげられる。

#### (c) RDO 方法による本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RDO 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA あるいはゲノム DNA を上記 1 の (1) の (a) に記載の方法を用い、調製する。

調製した cDNA あるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さの RDO のコンストラクトを設計し合成する。

合成した RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

各種宿主細胞への RDO の導入には、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (a) に記載の cDNA の調製方法などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (b) に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

DNA の塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにサブクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができ

る。

RDO は、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。

RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) 等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記 1 の (1) の (a) に記載の、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述 1 の (5) に記載の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述 4 または後述 5 に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

RDO は、Science, 273, 1386 (1996); Nature Medicine, 4, 285 (1998); Hepatology, 25, 1462 (1997); Gene Therapy, 5, 1960 (1999); J. Mol. Med., 75, 829 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8774 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8768 (1999); Nuc. Acids. Res.), 27, 1323 (1999); Invest. Dermatol., 111, 1172 (1998); Nature Biotech.), 16, 1343 (1998); Nature Biotech., 18, 43 (2000); Nature Biotech., 18, 555 (2000) 等の記載に従って設計することができる。

#### (d) RNAi 法による本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RNAi 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を上記 1 の (1) の (a) に記載の方法を用い、cDNA を調製する。

調製した cDNA の塩基配列を決定する。

決定した cDNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さの RNAi 遺伝子を設計する。

該 RNAi 遺伝子を細胞内で発現させるために、調製した cDNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体への組み込みが可能で、設計した RNAi 遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述 2 に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載されたcDNAの調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したRNAi遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。

RNAi遺伝子は、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。RNAi遺伝子のコンストラクトは、[Nature, 391, 806 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15502 (1998); Nature, 395, 854 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5049 (1999); Cell, 95, 1017 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959 (1998); Nature Cell Biol., 2, 70 (2000)]等の記載に従って設計することができる。

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、Nature Genet., 25, 35 (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子に突然変

異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

外来遺伝子としては、宿主細胞の DNA に変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

#### (2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、GMD を例として、そのドミナントネガティブ体に作製について具体的に以下に述べる。

大腸菌由来の GMD の立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸（133 番目のトレオニン、135 番目のグルタミン酸、157 番目のチロシン、161 番目のリシン）が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている（Structure, 8, 2, 2000）。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMD の補酵素 NADP や基質である GDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMD の酵素活性を担うこれら4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来の GMD のドミナントネガティブ体の作製の結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO 細胞由来の GMD（配列番号2）では、155 番目のトレオニン、157 番目のグルタミン酸、179 番目のチロシン、183 番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子（以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する）を用い、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型

糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を調製する。

調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長 DNA をもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 DNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述 2 に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 1 (1) の (a) に記載の方法があげられる。



細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

### (3) 酵素に突然変異を導入する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、F<sub>x</sub> などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

酵素に突然変異を導入する方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞の DNA に点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術第三版 (朝倉書店) 日本組織培養学会編 (1996)、Nature

Genet., 24, 314, (2000)等に記載の方法を挙げることができる。

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体を挙げることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項の 1 の (5) に記載の方法があげられる。

#### (4) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンス RNA/DNA 技術 [バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)] 等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項 1 の (5) に記載

の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

(5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、Somatic Cell Mol. Genet., 12, 51 (1986)等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワシタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等を挙げることができる。

具体的には、1 $\mu$ g/mL~1mg/mL の濃度の上述のレクチンを含む培地で1日~2週間、好ましくは1日~1週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養容器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明の N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

## 2. 抗体組成物の製造方法

本発明の抗体組成物は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発

現させて取得することができる。

抗ヒトガングリオシド GM2 抗体分子の全長 cDNA を調製し、該抗体分子をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体組成物を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、抗体を発現できるものであればいずれも用いることができる。

抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活した細胞を選択するか、または前述 1 に示された種々の人為的手法により得られた細胞を宿主細胞として用いることもできる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体中への組込が可能で、目的とする抗体分子をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

cDNA は、前記 1. の (1) の (a) に記載の cDNA の調製方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする抗体分子をコードする cDNA に特異的なプローブまたはプライマー等を用いて調製することができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキサースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF  $\alpha$ 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、

トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 75, 1929 (1978)] に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平 3-22979 ; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 [特開平 2-227075]、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen 社)、pREP4 (Invitrogen 社)、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭 63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [特開平 2-227075]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [特許第 2606856、特許第 2517813]、DEAE-デキス

トラン法 [バイオマニュアルシリーズ4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウイルスベクター法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)]等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、発現ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともに Invitrogen 社) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスである *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記発現導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Ti プラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルフ

アルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) [特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、WO94/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭 60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本特許第 2606856、日本特許第 2517813] 等をあげることができる。

抗体組成物の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載されている方法等に準じて、分泌生産、Fc 領域と他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫

酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15～40℃がよく、培養時間は、通常 16 時間～7 日間である。培養中の pH は 3～9 に保持する。pH の調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド等を、trp プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、Whitten 培地[発生工学実験マニュアルトランスジェニック・マウスの作り方 (講談社) 勝木元也編 (1987)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で 1～7 日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社)、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5 日間行う。



また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スコーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH5~9、20~40°Cの条件下で 3~60 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、抗体分子をコードする DNA を組み込んだ発現ベクターを保有する動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

抗体組成物の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ボールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、または特開平 05-336963、W094/23021 等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードする DNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードする DNA を挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に抗体分子を発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平 2-227075 に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を

用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996); American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産させる方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードする DNA を導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭 63-309192）または卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである  $\alpha$  カゼインプロモーター、 $\beta$  カゼインプロモーター、 $\beta$  ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードする DNA を導入したトランスジェニック植物を公知の方法 [組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21(1995); Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

抗体分子をコードする DNA を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分

離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学 (株) 製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose

FF (Pharmacia 社) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

以下に、本発明の抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物の製造方法について記すが、他の抗体組成物も当該方法と同様にして取得することができる。

#### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の C 領域としては、任意のヒト抗体の CH および CL であることができ、例えば、ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域 (以下、hC $\gamma$ 1 と表記する) およびヒト抗体の L 鎖の  $\kappa$  クラスの C 領域 (以下、hC $\kappa$  と表記する) 等があげられる。

ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色

体 DNA を用いることができ、また、mRNA から逆転写して作製された cDNA を用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]、免疫グロブリン H 鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)] とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖及び L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖及び L 鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]。タンデム型のヒト化抗体発現ベクターとしては、pKANTEX93 [Mol. Immunol., 37, 1035 (2000)]、pEE18 [Hybridoma, 17, 559 (1998)] などがあげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型 CDR 移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

## (2) ヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA の取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得することができる。

ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として用い、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージ或いはプラスミド等のベクターに挿入して cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体の C 領域或いは V 領域をコードする DNA をプローブとして用い、H 鎖 V 領域をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA を

有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体の VH および VL の全塩基配列を決定し、塩基配列より VH および VL の全アミノ酸配列を推定する。

ガングリオシド GM2 に特異的に結合できるヒト以外の動物の抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、ガングリオシド GM2 をヒト以外の動物に免疫し、周知の方法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, (1998)] に従って、免疫された動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とでハイブリドーマを作製し、次いで単一細胞化したハイブリドーマを選択し、これを培養し、培養上清から精製し、取得することができる。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成及び cDNA ライブラリー作製法としては、常法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λZAP II (Stratagene 社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech

社製)、入 ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] 及び pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)]、C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] 及び JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからのヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA クローンを選択する方法としては、アイソトープ或いは蛍光などで標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] により選択することができる。また、プライマーを調製し、cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34] により VH および VL をコードする cDNA を調製することもできる。

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377 DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより該 cDNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から VH および VL の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL を完全に含んでいるアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

さらに、抗体可変領域のアミノ酸配列または該可変領域をコードする DNA の塩基配列がす

でに公知である場合には、以下の方法を用いて製造することができる。

アミノ酸配列が公知である場合には、コドンの使用頻度 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮して該可変領域をコードする DNA 配列を設計し、設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行うことにより DNA を得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に 100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行うことにより DNA を得ることができる。

### (3) ヒト以外の動物の抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の VH および VL のアミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及び N 末端アミノ酸配列を推定でき、更には抗体が属するサブグループを知ることができる。また、VH および VL の各 CDR のアミノ酸配列についても、同様の方法で見出すことができる。

### (4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を、ヒト以外の動物の抗体 VH および VL の 3' 末端側の塩基配列とヒト抗体の CH および CL の 5' 末端側の塩基配列とからなり、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 DNA とそれぞれ連結し、それぞれを本項 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

### (5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を移植するヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank 等のデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミ

ノ酸配列、ヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] 等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列とできるだけ高い相同性 (少なくとも 60%以上) を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮して DNA 配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を設計する。設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率及び合成可能な DNA の長さから、H 鎖、L 鎖とも 4~6 本の合成 DNA を設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 2 の (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR 後、増幅産物を pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、本項 2 の (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を有するプラスミドを取得する。

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のみをヒト抗体の VH および VL の FR に移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体の VH および VL では、CDR のみならず、FR のいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基が CDR の移植に伴い、ヒト抗体の VH および VL の FR の異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型 CDR 移植抗体では、ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基や CDR の



アミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に由来するアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。

ヒト型 CDR 移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わる FR のアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのために X 線結晶解析 [J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)] 或いはコンピューターモデリング [Protein Engineering, 7, 1501 (1994)] 等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型 CDR 移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸残基の改変は、改変用合成 DNA を用いて本項 2 の (5) に記載の PCR 法を行うことにより、達成できる。PCR 後の増幅産物について本項 2 の (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

#### (7) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

本項 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、本項 2 の (5) および (6) で構築したヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を挿入し、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項 2 の (5) および (6) でヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

#### (8) ヒト化抗体の安定的生産

本項 2 の (4) 及び (7) に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型 CDR 移植抗体 (以下、併せてヒト化抗体と称す) を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2-257891; Cytotechnology, 3,133 (1990)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ細胞 YB2/0 細胞、IR983F 細胞、シリアンハムスター腎臓由来である BHK 細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 硫酸塩（以下、G418 と表記する；SIGMA 社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地（日水製薬社製）、GIT 培地（日本製薬社製）、EX-CELL302 培地（JRH 社製）、IMDM 培地（GIBCO BRL 社製）、Hybridoma-SFM 培地（GIBCO BRL 社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、FCS と表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [以下、ELISA 法と表記する； Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996] 等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996]。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖或いは抗体分子全体の分子量は、SDS 変性ポリアク

リルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS-PAGE と表記する ; Nature, 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996] 等で測定することができる。

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により抗体組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が抗体を発現する能力を有する場合には、上記 1 に記載した方法を用いて抗体組成物を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、本発明の抗体組成物を製造することができる。

### 3. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白質量、抗原との結合活性あるいは細胞傷害活性を測定する方法としては、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996、あるいは Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 等に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性は ELISA 法及び蛍光抗体法 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定することにより、評価することができる [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]。

また、抗体組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

### 4. 抗体組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体組成物の糖鎖構造は、通常の糖蛋白質組成物の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG 分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

### (1) 中性糖・アミノ糖組成分析

抗体組成物の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

具体的な方法として、Dionex 社製糖組成分析装置を用いる方法があげられる。BioLC は HPAEC-PAD ( high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法 [J. Liq. Chromatogr., 6, 1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [Agric.Biol.Chem., 55(1), 283 (1991)] に従って酸加水分解した試料を 2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC 分析して組成比を算出することができる。

### (2) 糖鎖構造解析

抗体組成物の糖鎖の構造解析は、2 次元糖鎖マップ法 [Anal. Biochem., 171, 73 (1988)、生物化学実験法 23-糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989 年)] により行うことができる。2 次元糖鎖マップ法は、例えば、X 軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y 軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、抗体組成物をヒドラジン分解して、抗体組成物から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PA と略記する) による糖鎖の蛍光標識 [J. Biochem., 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰の PA 化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2 次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa 社製)、文献 [Anal. Biochem., 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖の MALDI-TOF-MS などの質量分析を行い、2 次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

### 5. 抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。

本発明の抗体組成物は、Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 100%であり、高い ADCC 活性を示す。このような抗体組成物は、上記 4. に記載の抗体組成物の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた抗体組成物の糖鎖構造の識別は、文献 [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., (1995); 酵素免疫測定法, 第 3 版, 医学書院 (1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画 (1985)] 等に記載のウェスタン染色、RIA (Radioimmunoassay)、VIA (Viroimmunoassay)、EIA (Enzymoimmunoassay)、FIA (Fluoroimmunoassay)、MIA (Metalloimmunoassay) などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

抗体組成物を構成する抗体分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である抗体組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと抗体分子の複合体の量を測定する。

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (T. vulgaris 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (C. ensiformis 由来の concanavalin A)、RIC (R. communis 由来の毒素)、L-PHA (P. vulgaris 由来の leukoagglutinin)、LCA (L. culinaris 由来の lentil agglutinin)、PSA (P. sativum 由来の Pea lectin)、AAL (Aleuria aurantia Lectin)、ACL (Amaranthus caudatus Lectin)、BPL (Bauhinia purpurea Lectin)、DSL (Datura stramonium Lectin)、DBA (Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL (Elderberry Balk Lectin)、ECL (Erythrina cristagalli Lectin)、EEL (Euonymus europaeus Lectin)、GNL (Galanthus nivalis Lectin)、GSL (Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA (Helix pomatia Agglutinin)、HHL (Hippastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL (Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL (Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL (Maackia amurensis Lectin)、MPL (Maclura pomifera Lectin)、NPL (Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL (Psophocarpus tetragonolobus Lectin)、RCA (Ricinus communis Agglutinin)、STL (Solanum tuberosum Lectin)、SJA (Sophora japonica Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (Ulex europaeus Agglutinin)、VVL

(Vicia villosa Lectin)、WFA (Wisteria floribunda Agglutinin)があげられる。

N-グルコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) を挙げることができる。

#### 6. 本発明の抗体組成物の利用

本発明の抗体組成物はガングリオシド GM2 に特異的に結合し、高い ADCC 活性および CDC 活性を有するため、癌をはじめとする各種ガングリオシド GM2 発現細胞関連疾患の予防および治療において有用である。

本発明において、ガングリオシド GM2 関連疾患としては、ガングリオシド GM2 を発現する細胞が関与する疾患であればいかなるものも包含される。例えば、癌などがあげられる。

本発明の癌としては、神経外胚葉系腫瘍である神経芽細胞腫、胚小細胞癌およびメラノーマなどが包含される。

ガングリオシド GM2 は、正常細胞にはごく微量にしか存在しないが、肺小細胞癌、メラノーマ、神経芽細胞腫などの癌細胞では多量に存在し、GM2 に対するモノクローナル抗体は、これらの癌の治療に有用であると考えられている [Lancet, 48, 6154 (1988)]。通常の抗癌剤は、これらの癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、ADCC 活性または CDC 活性を有する抗体は、癌細胞に細胞死を誘導することができるため、通常の抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分であり、化学療法との併用療法が行われているが [Science, 280, 1197 (1998)]、本発明の抗体組成物は単独で高い抗癌効果を有するため、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

本発明の抗体組成物は、ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、ガングリオシド GM2 発現細胞に対して強い細胞傷害活性を示すので、ガングリオシド GM2 が発現した細胞を選択的に排除することができる。

また、本発明の抗体組成物は高い細胞傷害活性を有するため、従来の抗体組成物では治療することができない、上述の癌などの患者を治療することができる。さらに、癌の場合、癌細胞の浸潤部位に薬物が届きにくいいため、少量の薬物でも治療効果を有することが好ましい。本発明の抗体組成物は少量でも高い ADCC 活性を有するため、上述の疾患の治療に有用である。

本発明の抗体組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人1日当たり10 $\mu$ g/kg $\sim$ 20mg/kgである。

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC 活性測定法、ADCC 活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC 活性、ADCC 活性、抗腫瘍実験は、文献 [Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373 (1993)、CancerResearch, 54, 1511 (1994)] 等記載の方法に従って行うことができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミド pKOFUT8Neo の構築を示した図である。

第2図は、CHO/DG44 細胞の FUT8 対立遺伝子を1コピー破壊したヘミノックアウトクローンのゲノムサザンの解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ヘミノックアウトクローン 50-10-104 および親株である CHO/DG44 細胞のゲノムサザンである。

第3図は、CHO/DG44 細胞の FUT8 両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローン WK704 のゲノムサザン解析結果を示した図である。矢印は、相同組換えが起こった際に検出される陽性断片の検出位置を示す。

第4図は、CHO/DG44 細胞の FUT8 両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローンより薬剤耐性遺伝子を除去したクローンのゲノムサザン解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子除去クローン 4-5-C3、ダブルノックアウトクローン WK704、ヘミノックアウトクローン 50-10-104 および親株である CHO/DG44 細胞のゲノムサザンである。



第5図は、精製した Ms705/ GM2 抗体および DG44/ GM2 抗体のガングリオシド GM2 に対する ELISA 法における反応性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。横軸に抗体濃度を、縦軸に各抗体濃度における吸光度を示す。□が DG44/ GM2 抗体、■が Ms705/ GM2 抗体をそれぞれ示す。

第6図は、精製した Ms705/ GM2 抗体および DG44/ GM2 抗体のヒト小細胞性肺癌株 SBC-3 細胞に対する ADCC 活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。横軸に抗体濃度を、縦軸に各抗体濃度における細胞傷害活性を示す。●が DG44/ GM2 抗体、○が Ms705/ GM2 抗体をそれぞれ示す。

以下に、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 実施例

### 実施例 1

ゲノム上の  $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ（以下、FUT8 と表記する）両対立遺伝子を破壊した CHO/DG44 細胞の造成

FUT8 両対立遺伝子の翻訳開始コドンを含むゲノム領域を欠失させた CHO/DG44 細胞株を以下の手順で造成した。

#### 1. チャイニーズハムスターFUT8 遺伝子のエクソン 2 を含むターゲティングベクター pKOFUT8Neo の構築

WO02/31140 の実施例 13 の 1 項に記載の方法で構築されたチャイニーズハムスターFUT8 遺伝子のエクソン 2 を含むターゲティングベクター pKOFUT8Puro および pKOSelectNeo (Lexicon 社製)を用いて、以下の様にして pKOFUT8Neo を構築した。

pKOSelectNeo (Lexicon 社製)を制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101 社製)を用いてネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約 1.6Kb の AscI 断片を回収した。

次に、pKOFUT8Puro を制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製)で消化後、大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製)により、DNA 断片の末端を脱リン酸化させた。反応

後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を用いて、DNA断片を精製した。

上記で得た pKSelectNeo 由来の AscI 断片 (約 1.6Kb) 0.1 $\mu$ g と pKOFUT8Puro 由来の AscI 断片 (約 10.1Kb) 0.1 $\mu$ g に滅菌水を加えて 5 $\mu$ L とし、Ligation High (東洋紡社製) 5 $\mu$ L を加えて 16°C で 30 分間反応させることにより、連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより各々プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。この様にして第 1 図に示した pKOFUT8Neo を得た。pKOFUT8Neo は CHO 細胞の FUT8 遺伝子ヘミノックアウト細胞株を作製するためのターゲティングベクターとして用いた。

## 2. ゲノム上の FUT8 遺伝子の 1 コピーを破壊したヘミノックアウト細胞株の作製

### (1) ターゲティングベクター pKOFUT8Neo 導入株の取得

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO/DG44 細胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555, 1986] に、実施例 1 の 1 項で構築したチャイニーズハムスター FUT8 ゲノム領域ターゲティングベクター pKOFUT8Neo を以下の様にして導入した。

pKOFUT8Neo を制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) で消化して線状化し、線状化した 4 $\mu$ g の pKOFUT8Neo を  $1.6 \times 10^5$  個の CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入した後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) [透析 FBS (インビトロジェン社製) を 10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、接着細胞培養用 10cm デッシュ (Falcon 社製) へ播種した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、G418 (ナカライテスク社製) を 600 $\mu$ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS(10) [透析 FBS を 10% で含む IMDM 培地] 10mL に培地交換した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、15 日間の培養を行い、G418 耐性クローンを取得した。

### (2) ゲノム PCR による相同組換えの診断

本項(1)で取得した G418 耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いた PCR により、以下の様に行った。

96 穴プレート上の G418 耐性クローンに対してトリブシン処理を行った後、2 倍容量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

レプリカプレート上のネオマイシン耐性クローンは、G418 を  $600\mu\text{g/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS(10)で  $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、1 週間培養した後、細胞を回収し、回収した細胞から公知の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々  $30\mu\text{L}$  の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) [ $10\text{mmol/L}$  Tris-HCl、 $1\text{mmol/L}$  EDTA、 $200\mu\text{g/mL}$  RNase A] に一晩溶解した。

ゲノム PCR に用いるプライマーは以下の様に設計した。まず、W003/31140 の実施例 12 に記載の方法により取得した FUT8 ゲノム領域の配列 (配列番号 13) の中から、配列番号 39 または配列番号 40 でそれぞれ示されるプライマーをフォワードプライマーとした。また、ターゲティングベクターの loxP 配列に特異的に結合するプライマー (配列番号 41 または配列番号 42) をリバースプライマーとし、以下のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に用いた。上記で調製したゲノム DNA 溶液を各々  $10\mu\text{L}$  含む  $25\mu\text{L}$  の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  dNTPs、 $0.5\mu\text{mol/L}$  上記プライマー (フォワードプライマーとリバースプライマーを組み合わせる) ] を調製し、 $94^\circ\text{C}$  で 3 分間の加熱の後、 $94^\circ\text{C}$  で 1 分間、 $60^\circ\text{C}$  で 1 分間、 $72^\circ\text{C}$  で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとした条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を  $0.8\%$  (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、相同組換えによって生じる約  $1.7\text{Kb}$  の特異的増幅産物が認められた株を陽性クローンと判定した。

### (3) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項(2)で取得された陽性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いたサザンプロットにより、以下の様に行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、本項(2)で見出された陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、 $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、10 分間静置した後、陽性クローンに該当するウェル中の細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート (グライナー社製) へ播種し

た。G418 を  $600\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS(10)を用いて  $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。該プレートを  $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$  にて培養し、細胞を回収した。回収した細胞より公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), **3**, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々  $150\mu\text{L}$  の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) に一晚溶解した。

上記で調製したゲノム DNA  $12\mu\text{g}$  を制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) で消化し、エタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、 $20\mu\text{L}$  の TE 緩衝液 (pH8.0) [ $10\text{mmol}/\text{L}$  Tris-HCl,  $1\text{mmol}/\text{L}$  EDTA] に溶解し、 $0.6\%(\text{w}/\text{v})$  アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), **76**, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し  $80^\circ\text{C}$  で 2 時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。WO03/31140 の実施例 12 に記載の方法により取得した FUT8 ゲノム領域の配列 (配列番号 13) の中から、配列番号 43 および配列番号 44 でそれぞれ示されるプライマーを作製し、以下の PCR に用いた。

WO02/31140 の実施例 12 に記載の pFUT8fgE2-2  $4.0\text{ng}$  をテンプレートとして含む  $20\mu\text{L}$  の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol}/\text{L}$  dNTPs、 $0.5\mu\text{mol}/\text{L}$  上記プライマー] を調製し、 $94^\circ\text{C}$  で 1 分間の加熱の後、 $94^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $55^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $74^\circ\text{C}$  で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を  $1.75\%(\text{w}/\text{v})$  アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101 社製) を用いて約 230bp のプローブ DNA 断片を回収した。得られたプローブ DNA 溶液のうち  $5\mu\text{L}$  を、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP  $1.75\text{MBq}$  および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下の様に行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、 $15\text{mL}$  のハイブリダイゼーション液 [ $5\times\text{SSPE}$ 、 $50\times\text{Denhardt's}$  液、 $0.5\%(\text{w}/\text{v})$  SDS、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$  サケ精子 DNA] を加えて  $65^\circ\text{C}$  で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、 $^{32}\text{P}$  標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、 $65^\circ\text{C}$  で一晚ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [ $2\times\text{SSC}-0.1\%(\text{w/v})$  SDS] に浸漬し、 $65^{\circ}\text{C}$  で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [ $0.2\times\text{SSC}-0.1\%(\text{w/v})$  SDS] に浸漬し、 $65^{\circ}\text{C}$  で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ  $-80^{\circ}\text{C}$  で暴露し現像した。

第 2 図には、親株である CHO/DG44 細胞、および本項 (2) で取得した陽性クローンである 50-10-104 株のゲノム DNA を本法により解析した結果を示した。CHO/DG44 細胞では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片のみが検出された。一方、陽性クローン 50-10-104 株では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片に加え、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約 20.0Kb の断片が検出された。両断片の量比は 1:1 であったことから、50-10-104 株は、FUT8 対立遺伝子のうち 1 コピーが破壊されたヘミノックアウトクローンであることが確認された。

### 3. ゲノム上の FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞の作製

#### (1) ターゲティングベクター pKOFUT8Puro 導入株の作製

本実施例の 2 項で得た FUT8 遺伝子ヘミノックアウトクローンのもう一方の FUT8 対立遺伝子を破壊するために、WO02/31140 の実施例 13 の 1 項に記載のチャイニーズハムスター FUT8 遺伝子エクソン 2 ターゲティングベクターである pKOFUT8Puro を以下の様にして導入した。

pKOFUT8Puro を制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) で消化して線状化し、線状化した  $4\mu\text{g}$  の pKOFUT8Puro を  $1.6\times 10^6$  個の FUT8 遺伝子ヘミノックアウトクローンへエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) に懸濁し、接着細胞培養用 10cm デッシュ (Falcon 社製) へ播種した。 $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^{\circ}\text{C}$ 、24 時間培養後、ピューロマイシン (SIGMA 社製) を  $15\mu\text{g/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mL に培地交換した。この培地交換作業を 7 日毎に繰り返しながら  $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^{\circ}\text{C}$ 、15 日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性クローンを取得した。

#### (2) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項(1)で取得された薬剤耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いたサザンプロットにより以下の様に行った。

ピューロマイシン耐性クローンを、公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノグラス社製) へ採取し、ピューロマイシン (SIGMA 社製) を  $15\mu\text{g/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて  $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、接着細胞用平底 24 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。ピューロマイシン (SIGMA 社製) を  $15\mu\text{g/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて  $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、1 週間培養した後、同様にトリプシン処理を行い、接着細胞用平底 6 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。該プレートを  $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$  にて培養し、回収した細胞より公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々  $150\mu\text{L}$  の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) に一晚溶解した。

上記で調製したゲノム DNA  $12\mu\text{g}$  を制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) で消化し、エタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、 $20\mu\text{L}$  の TE 緩衝液 (pH8.0) に溶解し、 $0.6\%(\text{w/v})$  アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写後、ナイロン膜に対し  $80^\circ\text{C}$  で 2 時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、ターゲティングベクターに含まれる FUT8 ゲノム領域よりもさらに  $5'$  側の配列に特異的に結合するプライマー (配列番号 45 および配列番号 46) を作製し、以下の PCR に用いた。WO02/31140 の実施例 12 に記載のプラスミド pFUT8fgE2-2  $4.0\text{ng}$  をテンプレートとして含む  $20\mu\text{L}$  の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  dNTPs、 $0.5\mu\text{mol/L}$  上記プライマー] を調製し、 $94^\circ\text{C}$  で 1 分間の加熱の後、 $94^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $55^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $74^\circ\text{C}$  で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を  $1.75\%(\text{w/v})$  アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101 社製) を用いて約  $230\text{bp}$  のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液のうち  $5\mu\text{L}$  を、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$   $1.75\text{MBq}$  および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下の様に行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mL のハイブリダイゼーション液 [5×SSPE、50×Denhardt's 液、0.5%(w/v) SDS、100 $\mu$ g/mL サケ精子 DNA] を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、<sup>32</sup>P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [2×SSC-0.1%(w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [0.2×SSC-0.1%(w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で暴露し現像した。

第 3 図には、50-10-104 株から本項(1)に記載の方法により取得したビューロマイシン耐性クローンの 1 つである WK704 株のゲノム DNA を本法により解析した結果を示した。WK704 株では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片が消失し、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約 20.0Kb の断片 (図中に矢印で示す) のみが検出された。この結果から WK704 株は、FUT8 両対立遺伝子が破壊されたクローンであることが確認された。

#### 4. FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

##### (1) Cre リコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例の 3 項で取得した FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子を除去することを目的として、Cre リコンビナーゼ発現ベクター pBS185 (Life Technologies 社製) を以下の様にして導入した。

4 $\mu$ g の pBS185 を  $1.6 \times 10^8$  個の FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローンへエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mL に懸濁し、さらに同培地を用いて 2 万倍に希釈した。該希釈液を接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 7 枚へ播種後、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、10 日間の培養を行い、コロニーを形成させた。

##### 5. Cre リコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項(1)で取得したコロニーのうち、任意のクローンを公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノグラス社

製)へ採取し、IMDM-dFBS(10)-HT(1)を用いて5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、1週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対してトリブシン処理を行い、2倍容量の凍結培地[20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM]を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底96穴プレート(旭テクノガラス社製)へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

次にレプリカプレート上の細胞を、G418を600 $\mu$ g/mL、ピューロマイシンを15 $\mu$ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)-HT(1)を用いて5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、一週間培養した。Creリコンビナーゼの発現によりloxP配列に挟まれた薬剤耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、G418およびピューロマイシン存在下で死滅する。本法により陽性クローンを選択した。

### (3) ゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項(2)で選択した陽性クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、上記陽性クローンを含む96穴プレートを選択し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、10分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底24穴プレート(グライナー社製)へ播種した。IMDM-dFBS(10)-HT(1)を用いて1週間培養した後、トリブシン処理を行い、接着細胞用平底6穴プレート(グライナー社製)へ播種して5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°Cで培養し、増殖した細胞を回収した。回収した細胞より公知の方法[ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)]に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々150 $\mu$ LのTE-RNase緩衝液(pH8.0)に一晩溶解した。

上記で調製したゲノムDNA 12 $\mu$ gを制限酵素NheI(New England Biolabs社製)で消化し、エタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、20 $\mu$ LのTE緩衝液(pH8.0)に溶解し、0.6%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)]に従って、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し80°Cで2時間の熱処理を行い、固定化した。



一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。ターゲティングベクターに含まれる FUT8 ゲノム領域よりもさらに 5' 側の配列に特異的に結合するプライマー（配列番号 45 および配列番号 46）を用いて、以下の PCR を行った。WO02/31140 の実施例 12 に記載の pFUT8fgE2-2 4.0ng をテンプレートとして含む 20  $\mu$ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記プライマー] を調製し、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、74°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BI0101 社製) を用いて、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液のうち 5  $\mu$ L を、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下の様に行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5 $\times$ SSPE、50 $\times$  Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100  $\mu$ g/mL サケ精子 DNA] 15mL を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーション後、<sup>32</sup>P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [2 $\times$ SSC-0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [0.2 $\times$ SSC-0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で暴露し現像した。

第 4 図には、親株である CHO/DG44 細胞、本実施例の 2 項に記載の 50-10-104 株、本実施例の 3 項に記載の WK704 株、および WK704 株から本項(2)に記載の方法により取得した薬剤感受性クローンの 1 つである 4-5-C3 株のゲノム DNA を、本法により解析した結果を示した。

CHO/DG44 細胞では、野生型 FUT8 対立遺伝子に由来する約 8.0Kb の DNA 断片のみが検出された。また、50-10-104 株や WK704 株では、相同組換えが起こった対立遺伝子に由来する約 9.5Kb の DNA 断片が認められた。一方、4-5-C3 株では、相同組換えが起こった対立遺伝子からさらにネオマイシン耐性遺伝子 (約 1.6Kb) およびピューロマイシン耐性遺伝子 (約 1.5Kb) が除去

されて生じる約 8.0Kb の DNA 断片のみが検出された。この結果から 4-5-C3 株は、Cre リコンビナーゼにより薬剤耐性遺伝子が除去されたことが確認された。

薬剤耐性遺伝子の除去された FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン（以下、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞と表記する）は、4-5-C3 株以外にも複数株取得された。

## 実施例 2

FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞による抗ガングリオシド GM2 ヒト CDR 移植抗体組成物の発現

### 1. FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例 1 の 4 項に記載の FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞および親株である CHO/DG44 細胞に、特開平 10-257893 記載の抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX796HM2Lm-28No.1 を導入し、抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

pKANTEX796HM2Lm-28No.1 を制限酵素 AatII (New England Biolabs 社製) で消化して線状化した後、直線状化された 10 $\mu$ g の pKANTEX1259HV3LV0 を  $1.6 \times 10^6$  個の FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞および親株である CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]により導入後、10mL の IMDM-dFBS (10)-HT(1) [透析 FBS(インビトロジェン社製)を 10%、HT supplement(インビトロジェン社製)を 1 倍濃度で含む IMDM 培地(インビトロジェン社製)] に懸濁し、75cm<sup>2</sup> フラスコ (グライナー社製) に播種した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、G418 (ナカライテスク社製) を 500 $\mu$ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS(10) [透析 FBS を 10% で含む IMDM 培地] に培地交換し、1~2 週間培養した。最終的に G418 を 500 $\mu$ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GM2 ヒト型 CDR 移植抗体を生産する形質転換株を得た。親株の CHO/DG44 細胞より得られた形質転換株を DG44/GM2 株、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株を Ms705/GM2 株と名付けた。

### 2. 培養上清中のヒト IgG 抗体濃度の測定 (ELISA 法)

ヤギ抗ヒト IgG(H&L)抗体(American Qualex 社製)を Phosphate Buffered Saline (以下、PBS と表記する) (インビトロジェン社製) で希釈して 1 $\mu$ g/mL とし、96 穴の ELISA 用プレート

(グライナー社製) に、50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、BSA を1%の濃度で含むPBS (以下、1%BSA-PBS と表記する) (和光純薬社製) を100  $\mu$ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清、または培養上清から精製した抗体の各種希釈溶液を50  $\mu$ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween20 を0.05%の濃度で含むPBS (以下、Tween-PBS と表記する) (和光純薬社製) で各ウェルを洗浄後、1%BSA-PBS で2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ50  $\mu$ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム (和光純薬社製) の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素 (和光純薬社製) を1  $\mu$ L/mLで添加した溶液]を50  $\mu$ L/ウェルに加えて発色させ、415nmの吸光度 (以下、OD415 と表記する) を測定した。

### 3. 抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の精製

実施例2の1項で得られた形質転換細胞株 DG44/GM2 株および Ms705/GM2 株を用いて、それぞれが生産する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物を以下のようにして精製した。

各々の形質転換株を、G418 を500  $\mu$ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)に懸濁し、30mLを182cm<sup>2</sup>フラスコ (グライナー社製) に播種して5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、数日間培養した。細胞密度がコンフルエントになった時点で培養上清を除去し、25mLのPBSで細胞を洗浄後、EXCELL301培地 (JRH Biosciences 社製) 30mLを注入した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、7日間培養後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4°Cの条件で5分間の遠心分離を行って上清を回収した後、0.22  $\mu$ m孔径 Millex GV フィルター (ミリポア社製) を用いて濾過滅菌した。上述の方法により取得した培養上清より、Mab Select (Amersham Biosciences 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物を精製した。精製した抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物は、DG44/GM2 株より得られた抗体組成物を DG44/GM2 抗体、Ms705/GM2 株より得られた抗体組成物を Ms705/GM2 抗体と名付けた。

### 実施例 3

FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞が生産する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の生物活性

#### 1. 抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物のガングリオシド GM2 に対する結合活性 (ELISA 法)

実施例 2 の 3 項で精製した DG44/GM2 抗体および Ms705/GM2 抗体のガングリオシド GM2 に対する結合活性を、以下のようにして測定した。

57.5ng のガングリオシド GM2 (シグマ社製) を 10ng のフォスファチジルコリン (シグマ社製) と 5ng のコレステロール (シグマ社製) とを含む 2mL のエタノール溶液に溶解した。この溶液 20  $\mu$ L を 96 穴の ELISA 用プレート (グライナー社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%BSA-PBS 溶液を 100  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、実施例 2 の 3 項で調製した DG44/GM2 抗体または Ms705/GM2 抗体の各種希釈溶液を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で各ウェルを洗浄後、1%BSA-PBS 溶液で 2000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG(H&L)抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。

第 5 図には、DG44/GM2 抗体および Ms705/GM2 抗体のガングリオシド GM2 に対する結合活性を示した。両抗体はガングリオシド GM2 に対して同等の結合活性を有していた。

#### 2. 抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の *in vitro* 細胞傷害活性 (ADCC 活性)

実施例 2 の 3 項で得られた DG44/GM2 抗体および Ms705/GM2 抗体の *in vitro* 細胞傷害活性を以下のようにして測定した。

##### (1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FCS(10) 培地 [10%FCS を含む RPMI1640 培地 (インビトロジェン社製)] で培養したヒト肺小細胞癌株 SBC-3 細胞 (JCRB 0818) を、遠心分離操作及び懸濁により RPMI1640-FCS(5)培地 [5%FCS を含む RPMI1640 培地 (インビトロジェン社製)] で洗浄した後、RPMI1640-FCS(5) 培地によって、 $2 \times 10^5$  細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

## (2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）0.5mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep（AXIS SHIELD 社製）を用いて、添付の使用説明書に従い単核球層を分離した。RPMI1640-FCS(5) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、同培地を用いて  $5 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

## (3) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を  $50 \mu\text{L}$  ( $2.5 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 25:1 となる) 添加した。更に、各種抗 GM2 ヒト型 CDR 移植抗体を各最終濃度 0.1~1000ng/mL となるように加えて全量を  $150 \mu\text{L}$  とし、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)活性を、CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社製) を用いて、添付の説明書にしたがって吸光度データを取得することで測定した。標的細胞自然遊離の吸光度データは、エフェクター細胞溶液および抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、また、エフェクター細胞自然遊離の吸光度データは、標的細胞溶液および抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、上記と同様の操作を行うことで取得した。標的細胞全遊離の吸光度データは、抗体溶液、エフェクター細胞溶液の代わりに培地を用い、反応終了 45 分前に  $15 \mu\text{L}$  の 9% Triton X-100 溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の LDH 活性を測定することにより求めた。ADCC 活性は次式により求めた。

$$\text{細胞傷害活性} = \{ [\text{検体の吸光度}] - [\text{エフェクター細胞自然遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}] \} / \{ [\text{標的細胞全遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}] \}$$

第 6 図には、DG44/GM2 抗体および Ms705/ GM2 抗体のヒト肺小細胞癌株 SBC-3 細胞に対する細胞傷害活性を示した。Ms705/ GM2 抗体はいずれの抗体濃度においても DG44/ GM2 抗体よりも高い ADCC 活性を示し、最高細胞傷害活性値も高い値を示した。

## 実施例 4

FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞が生産する抗 GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の単糖組成分析

実施例 1 の 3 項で精製した DG44/GM2 抗体および Ms705/GM2 抗体の中性糖・アミノ糖組成分析を、以下の様にして行った。

抗体を遠心濃縮機で減圧下乾固した後、2.0~4.0mM のトリフルオロ酢酸溶液を加えて 100°C、2~4 時間酸加水分解を行い、タンパク質から中性糖・アミノ糖を遊離した。トリフルオロ酢酸溶液を遠心濃縮機で除去し、脱イオン水に再溶解して Dionex 社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分析を行った。CarboPac PA-1 カラム、CarboPac PA-1 ガードカラム (Dionex 社製) を用い、溶離液として 10~20mM 水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液、洗浄液として 500mM 水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液を使用して、第 1 表に示した溶出プログラムで分析した。

第 1 表

中性糖・アミノ糖組成分析の溶出プログラム

時間 (分)	0	35	35.1	45	45.1	58
溶離液 (%)	100	100	0	0	100	100
洗浄液 (%)	0	0	100	100	0	0

得られた溶出プロファイルの中性糖・アミノ糖成分のピーク面積から、N-アセチルグルコサミン比を 4 とした場合の各成分 (フコース、ガラクトース、マンノース) の組成比を算出した。

第 2 表に各抗体の単糖組成比により計算される、全 N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を示した。DG44/GM2 抗体ではフコースが結合していない糖鎖の割合が 4% であった。一方、Ms705/GM2 抗体ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖

の割合はほぼ 100%と見積もられた。

以上の結果より、Ms705/GM2 抗体の N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

第 2 表

抗 GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物のフコースが結合していない糖鎖の割合

抗体名      フコースを含まない糖鎖率 (%)

DG44/GM2 抗体      4%

Ms705/GM2 抗体      ~100%

#### 実施例 5

フコースが結合していない糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の生物活性の解析

実施例 3 の 2 項において、Ms705/GM2 抗体が DG44/GM2 抗体よりも高い ADCC 活性を有することを示した (第 6 図)。本実施例では、本発明のフコースが結合していない糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の優位性をさらに明らかにするため、フコースが結合した糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体が混合された抗体組成物との生物活性の比較を以下のようにして行った。

フコースが結合していない糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体からなる Ms705/GM2 抗体に、フコースが結合した糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体を混合させた場合の細胞傷害活性の変化を調べた。抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体の ADCC 活性は、以下のようにして測定した。

##### 1. 標的細胞溶液の調製

実施例 3 の 2 項の (1) に記載の方法に従って行った。

##### 2. エフェクター細胞溶液の調製

実施例 3 の 2 項の (2) に記載の方法に従って単核球層を分離し、RPMI1640-FCS(5)培地を用いて  $4 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

##### 3. ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに、上記 (1) で調製した標的細胞溶液を  $50\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) 分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を  $50\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。更に、Ms705/GM2 抗体および DG44/GM2 抗体をそれぞれ単独で、または両者を混合して加えて全量を  $150\mu\text{L}$  とし、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を LDH-Cytotoxic Test Wako (和光純薬社製) を用いて添付の説明書に従い測定した。ADCC 活性は実施例 3 の 2 項に記載の方法に従って算出した。

一定量の Ms705/GM2 抗体に DG44/GM2 抗体を添加することで、一定量のフコース非結合型抗体を含み、かつフコース非結合型抗体の割合を変化させた抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物、即ち、一定量の Ms705/GM2 抗体に、Ms705/GM2 抗体の 0~100 倍量の DG44/GM2 抗体を添加した抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物を調製し、該抗体組成物の ADCC 活性を測定した。

Ms705/GM2 抗体にさらに Ms705/GM2 抗体を添加すると、総抗体量の増加にともなって ADCC 活性の上昇が観察された。一方、Ms705/GM2 抗体にさらに DG44/GM2 抗体を添加すると、総抗体濃度が増加するにも関わらず調製した抗体組成物の ADCC 活性は逆に低下した。このことは、フコースが結合した糖鎖を有する抗体分子が、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子の活性を阻害することを示している。また、フコースが結合した糖鎖を有する抗体分子とフコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子が混合された抗体組成物においても、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子の割合が 20% 以上の抗体組成物では、該割合が 20% 未満の抗体組成物に比べ顕著に高い ADCC 活性を示した。さらに、Ms705/GM2 抗体サンプルと、同じ量の Ms705/GM2 抗体に 9 倍量の DG44/GM2 抗体を加えた抗体サンプルの ADCC 活性を測定した。Ms705/GM2 抗体の ADCC 活性は、DG44/GM2 抗体を加えることで大幅に低下した。Ms705/GM2 抗体と DG44/GM2 抗体の存在比が 1 対 9 のまま抗体組成物の抗体濃度を 100 倍に上昇させても、その 1/100 の抗体濃度の Ms705/GM2 抗体サンプルの ADCC 活性には及ばなかった。このことは、本発明のフコースが結合していない糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体分子のみからなる抗体組成物の医薬としての優位性を示している。



したがって、本発明のフコースが結合していない糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物によって、これまでの抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体分子を含む抗体組成物では治療できなかった患者を治療することができる。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 22-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 23-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 24-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 25-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 26-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 27-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 28-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 29-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 30-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 31-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 32-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 33-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 34-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 35-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 36-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 37-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 38-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 39-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 40-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 41-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 42-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 43-人工配列の説明：合成 DNA

## 請求の範囲

1. ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物。
2. N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖である、請求の範囲 1 に記載の抗体組成物。
3. ガングリオシド GM2 発現細胞に特異的に結合する請求の範囲 1 または 2 に記載の抗体組成物。
4. ガングリオシド GM2 発現細胞に対し細胞傷害活性を示す請求の範囲 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
5. ガングリオシド GM2 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す請求の範囲 1～4 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
6. 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性である請求の範囲 4 または 5 に記載の抗体組成物。
7. 細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性である請求の範囲 4 または 5 に記載の抗体組成物。
8. それぞれ配列番号 14、15 および 16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖(H鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、請求の範囲 1～7 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
9. それぞれ配列番号 17、18 および 19 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子軽鎖(L鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、請求の範囲 1～7 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
10. それぞれ配列番号 14、15 および 16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 17、18 および 19 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、請求の範囲 1～9 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

11. 遺伝子組換え抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型 CDR 移植抗体である請求の範囲 1～10 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
12. ヒト型キメラ抗体がガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、請求の範囲 11 に記載の抗体組成物。
13. 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 20 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 12 に記載の抗体組成物。
14. 抗体分子の軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 12 に記載の抗体組成物。
15. 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 20 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 12～14 のいずれか 1 項に記載のヒト型キメラ抗体組成物。
16. ヒト型 CDR 移植抗体がガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、請求の範囲 11 に記載の抗体組成物。
17. ガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR) を含む、請求の範囲 16 に記載の抗体組成物。
18. ガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体の H 鎖定常領域 (C 領域) および L 鎖 C 領域を含む、請求の範囲 16 または 17 に記載の抗体組成物。
19. 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～18 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
20. 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目

の Ser および 98 番目の Arg のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～18 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

21. 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～18 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

22. 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～18 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

23. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～19 または 21 に記載の抗体組成物。

24. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、

72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～18、20 または 21 に記載の抗体組成物。

25. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～18、20 または 22 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

26. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、それぞれ配列番号 22、26、27、28、29 および 30 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～20、23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

27. 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、それぞれ配列番号 31、32、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む請求の範囲 16～18、21～25 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

28. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 22、26、27、28、29、30 で示されるから選ばれるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含み、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 31、32、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む請求の範囲 16～27 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

29. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号 31 または 32 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 16～19、21、23、26～28 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

30. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号 32 または 35 で示されるアミノ酸配列を

含む請求の範囲 16~19、21~23、26~28のいずれか1項に記載の抗体組成物。

31. ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる、請求の範囲 1~30のいずれか1項に記載の抗体組成物を生産する形質転換体。

32. 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素を失活するようにゲノムが改変された細胞である、請求の範囲 31 に記載の形質転換体。

33. 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞である、請求の範囲 31 に記載の形質転換体。

34. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) または GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) から選ばれる酵素である、請求の範囲 32 または 33 に記載の形質転換体。

35. GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 34 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

36. GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a)~(c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 34 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

37. GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a)および(b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲34に記載の形質転換体。

(a) 配列番号3で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号3で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

38. GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a)~(c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲34に記載の形質転換体。

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

39. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼである請求の範囲32または33に記載の形質転換体。

40.  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)~(d)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲39に記載の形質転換体。

(a) 配列番号5で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号6で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号5で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号6で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

41.  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)~(f)からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲39に記載の形質転換体。

- (a) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (c) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (d) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (f) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

4 2. 形質転換体が FERM BP-8470 である請求の範囲 4 1 に記載の形質転換体。

4 3. 宿主細胞が、下記の(a)～(i)からなる群から選ばれる細胞である請求の範囲 3 1～4 2 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

4 4. 請求の範囲 3 1～4 3 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、請求の範囲 1～3 0 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物の製造方法。

4 5. 請求の範囲 4 4 に記載の製造方法により得られる、請求の範囲 1～3 2 のいずれか



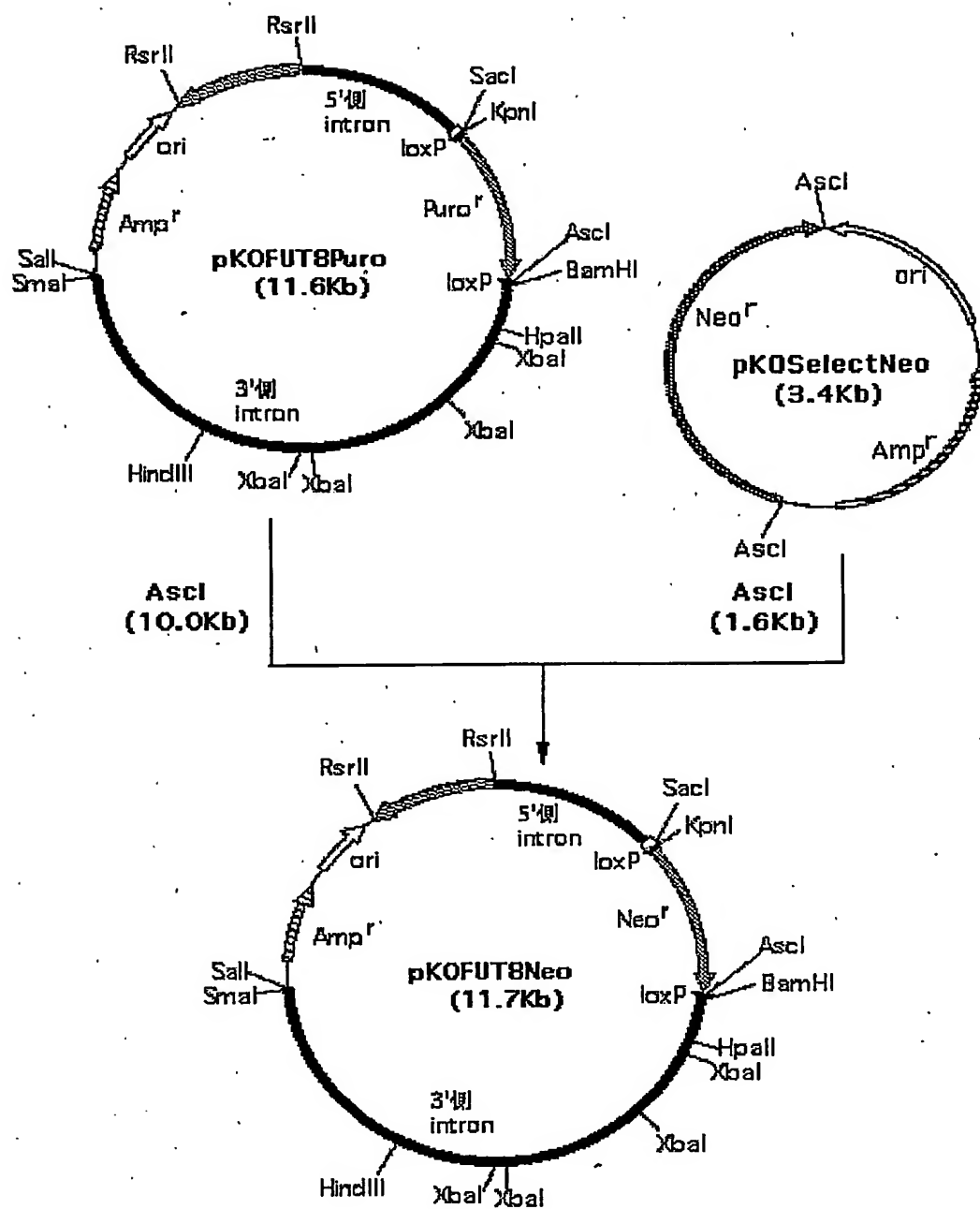
1項に記載の抗体組成物。

46. 請求の範囲1～30および45のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

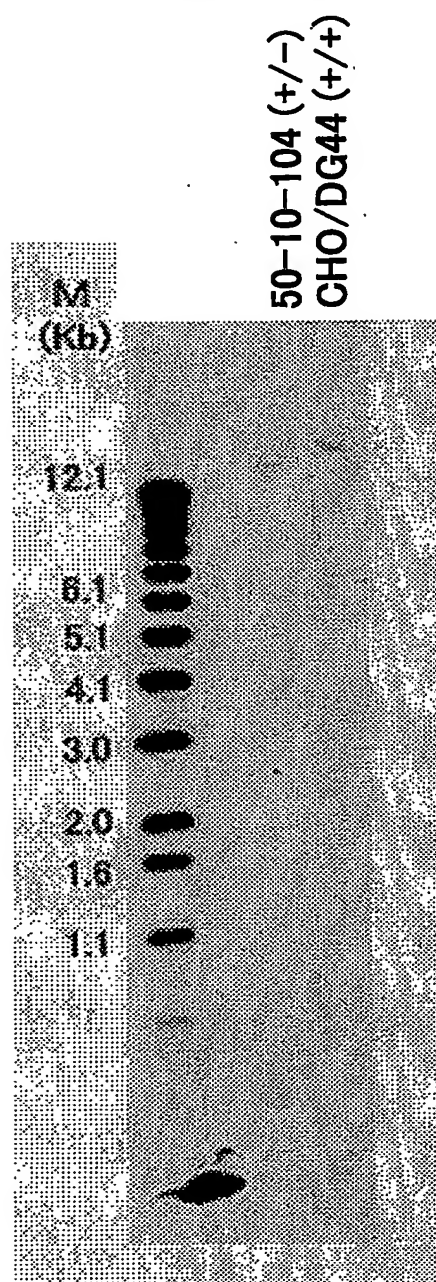
47. 請求の範囲1～30および45のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有するガングリオシド GM2 関連疾患の治療薬。

48. ガングリオシド GM2 関連疾患が癌である請求の範囲47に記載の治療薬。

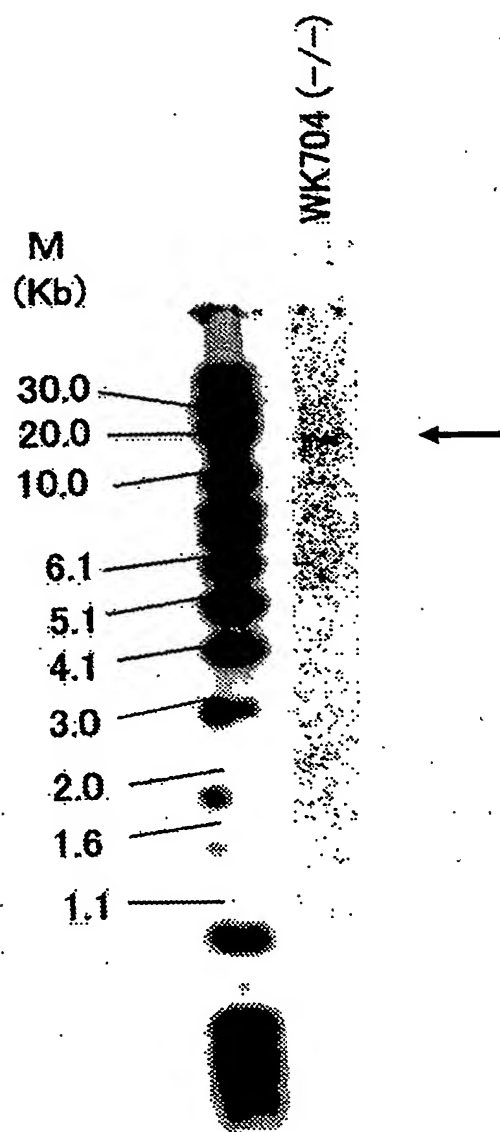
## 第 1 図



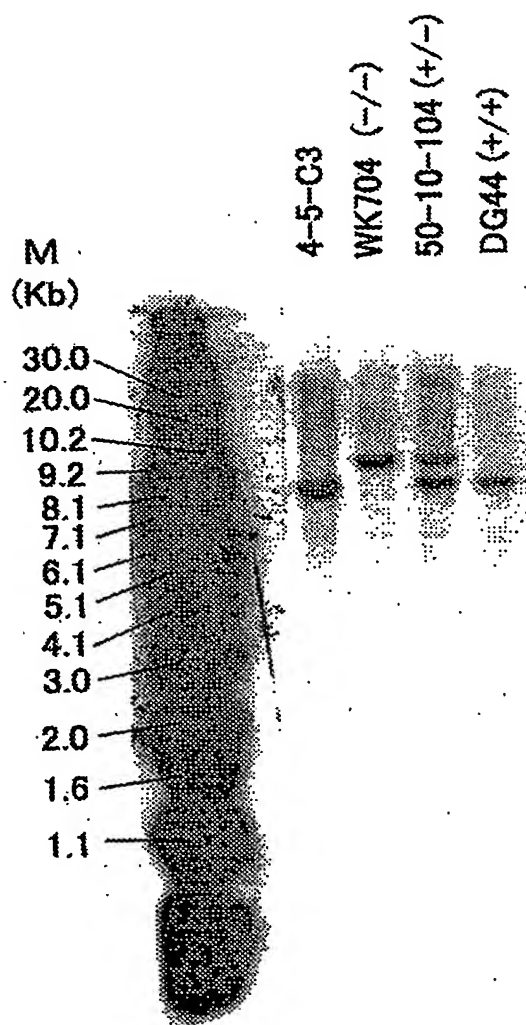
# 第 2 図



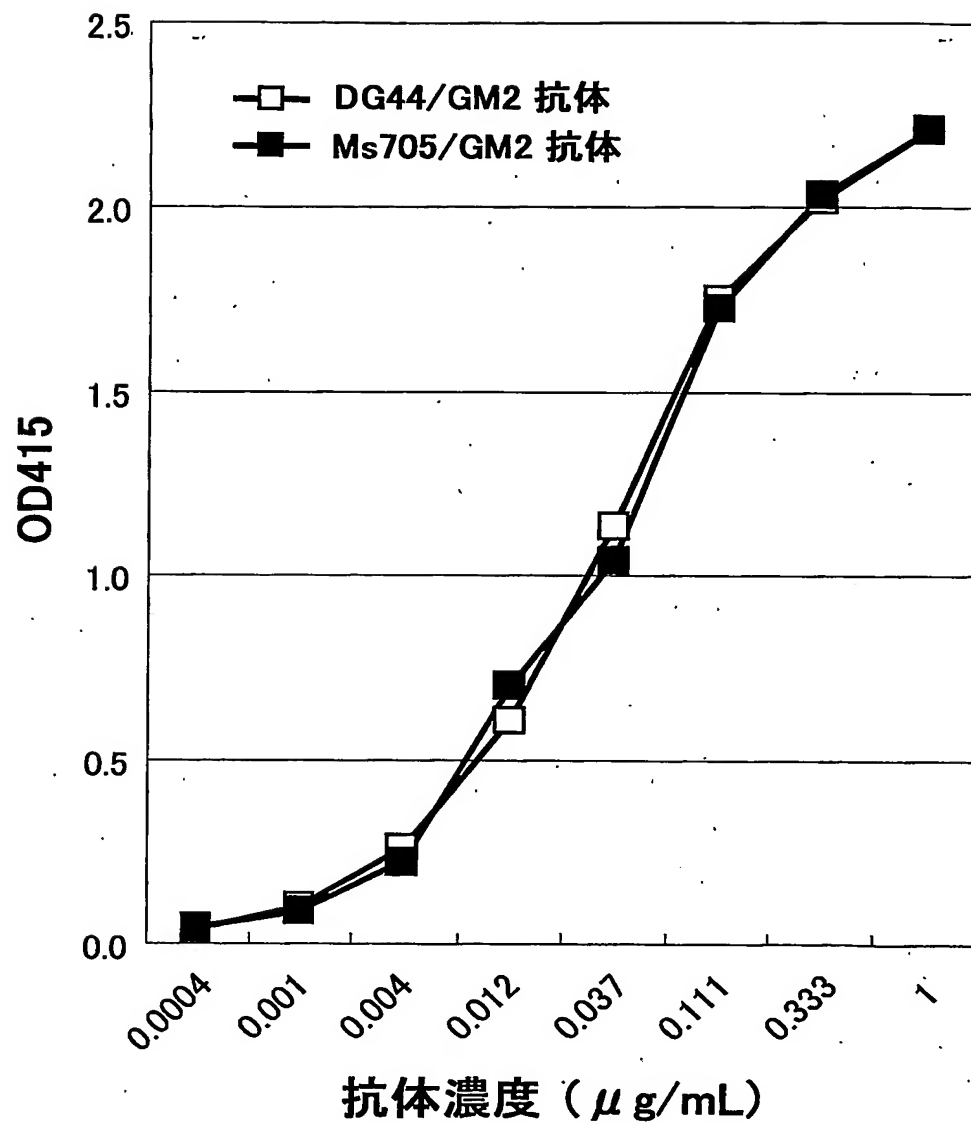
# 第 3 図



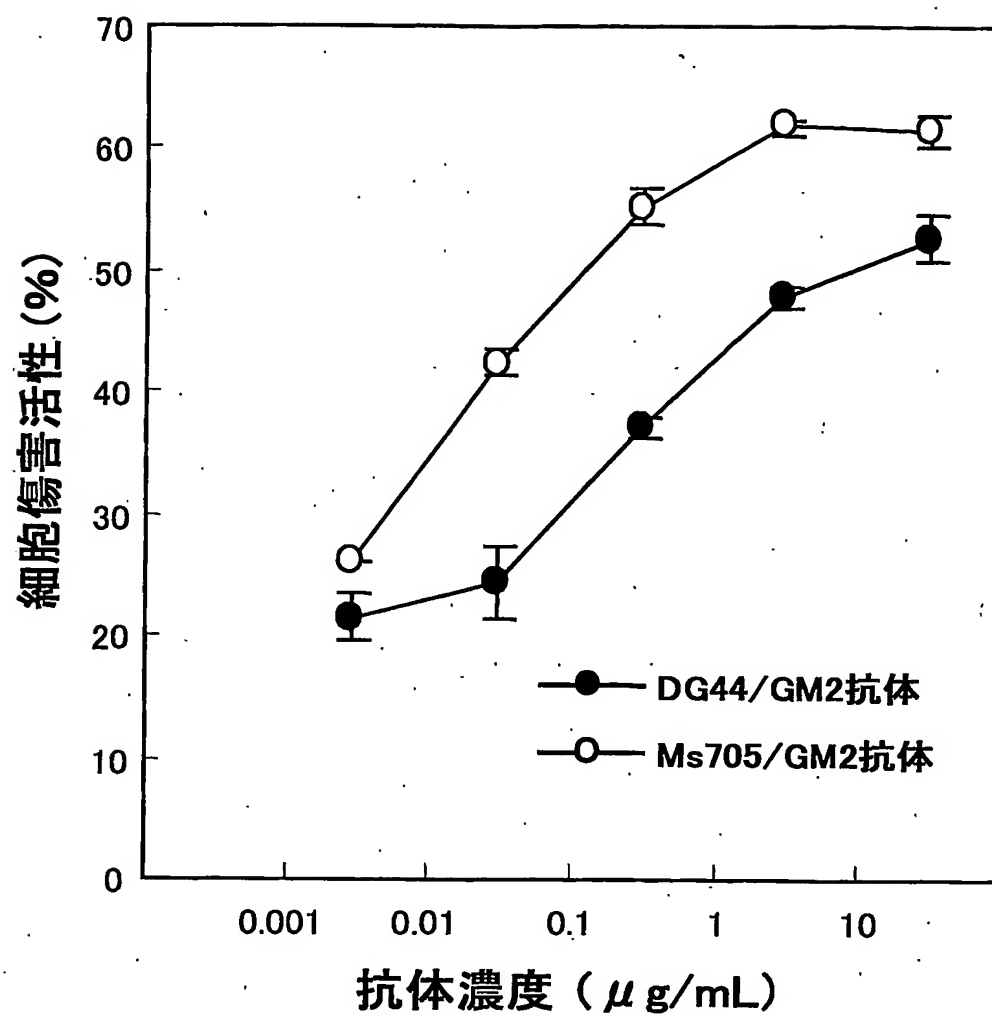
## 第 4 図



第 5 図



第 6 図



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Ganglioside GM2-specific antibody composition

<130> 11622W01

<150> P2003-350168

<151> 2003-10-09

<150> P2004-129431

<151> 2004-04-26

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1504

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

<400> 1

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac 48  
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp  
1 5 10 15

ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc 96  
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr  
20 25 30

ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac 144  
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr



35	40	45	
gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga			192
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg			
50	55	60	
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg			240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met			
65	70	75	80
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc			288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile			
85	90	95	
atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc			336
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser			
100	105	110	
cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat			384
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp			
115	120	125	
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt			432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu			
130	135	140	
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga			480
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly			
145	150	155	160
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg			528
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg			
165	170	175	
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac			576
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn			
180	185	190	

ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat	624
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn	
195 200 205	
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc	672
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser	
210 215 220	
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg	720
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu	
225 230 235 240	
gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc	768
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val	
245 250 255	
gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc	816
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val	
260 265 270	
ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca	864
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser	
275 280 285	
ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat	912
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn	
290 295 300	
gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat	960
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp	
305 310 315 320	
ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc	1008
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys	
325 330 335	
tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac	1056

Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp  
 340 345 350

gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc 1104  
 Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr  
 355 360 365

aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaatc gcgagacatg gactatggtg 1159  
 Asn Pro Asn Ala  
 370

cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa ccctcgactg 1219  
 cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac 1279  
 actccagagc taaggccact tcgttttgt caaaggctcc tctcaatgat tttgggaaat 1339  
 caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaa at 1399  
 ttttgagtct tgagattgtt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaccagca 1459  
 aaaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1504

<210> 2

<211> 372

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 2

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp  
 1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr  
 20 25 30

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr  
 35 40 45

Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg  
 50 55 60

Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met

65

70

75

80

Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile  
 85 90 95

Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser  
 100 105 110

His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp  
 115 120 125

Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu  
 130 135 140

Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly  
 145 150 155 160

Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg  
 165 170 175

Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn  
 180 185 190

Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn  
 195 200 205

His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser  
 210 215 220

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu  
 225 230 235 240

Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val  
 245 250 255

Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val  
 260 265 270

Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser  
 275 280 285

Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn  
 290 295 300

Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp  
 305 310 315 320

Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys  
 325 330 335

Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp  
 340 345 350

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr  
 355 360 365

Asn Pro Asn Ala  
 370

<210> 3

<211> 1316

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 3

gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60

tggactggtg gaacctgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120

gacctagtg acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180

tggcgctggc ttaccoggag aggaatgggt gtttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240

ggatgcagca caaacccaag ccctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300

tgctgcaatg gtaggaggcc ttttccggaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360  
gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctcagctttc gaggtgggca ctgcaaggt 420  
ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480  
aatgateccac aatgggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540  
gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcaccttca ctgctgtcat 600  
ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660  
tggcctcatc cataaggtgc atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720  
tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctcactggac ctagcccggc tcttcatctg 780  
ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggcg aggaagatga 840  
agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900  
cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960  
tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020  
tgcctgggtc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080  
tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca tttgcttgc aagaactgag 1140  
gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200  
atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca cttgtttgt 1260  
ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggctcctg ctgtccctg tctaga 1316

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cricetulus griseus

&lt;400&gt; 4

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly  
 20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu  
 35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr  
 50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile  
 65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn  
 85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys  
 100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu  
 115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser  
 130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln  
 145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro  
 165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile

180 185 190  
 His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp  
 195 200 205  
 Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala  
 210 215 220  
 Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala  
 245 250 255  
 Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp  
 260 265 270  
 Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys  
 275 280 285  
 Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala  
 290 295 300  
 Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg  
 305 310 315 320

Lys

<210> 5

<211> 2008

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 5

aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tccaattcct 60



tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120  
tggcggttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tatagggtgt 180  
catttggttc gagataatga ccacctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240  
gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagaattga ggagaatggc tgagtctctc 300  
cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgtttttagaa 360  
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420  
ctgggaaagg atcatgaaat cttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480  
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540  
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600  
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660  
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720  
agaaagctgg tatgtaatat caacaaagc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780  
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcattcttga atctcagaat 840  
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgttttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900  
gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960  
gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020  
gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatacctgc agtgtgggtg 1080  
gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140  
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200

gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260  
 gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gatatctggcc 1320  
 actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380  
 agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440  
 cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500  
 tcateccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560  
 gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620  
 attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680  
 atcattggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aagggtgtcaa cagaaaacta 1740  
 ggaaaaacag gcctgtaccc ttctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800  
 cctacatata ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860  
 gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920  
 gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctgggtggaac gcctctttgt 1980  
 gaagggtgc tgtgccctca agcccatg 2008

<210> 6

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60

ttgttatttt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcaactccagc 120  
agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180  
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240  
ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300  
aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360  
aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420  
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480  
aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540  
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600  
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660  
ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcattgattg cttatggcac ccagcgaaca 720  
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactgggtg gatgggagac tgtgtttaga 780  
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcaggatgaa 840  
gtaaatgaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccacctcgg 900  
cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960  
ggtgaccctg cagtgtgggtg ggtgtcccag tttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020  
tggttggaag aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080  
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca cccatcgag 1140  
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200

aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260  
 tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320  
 cggtagacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380  
 gactttctag tgtgtacttt ttcatcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440  
 accctgcac ctagatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500  
 ggccaaaatg cccacaatca gattgctgtt taccctcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560  
 attccaatgg aacctggaga tatcattggt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620  
 aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680  
 aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 575

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cricetulus griseus

&lt;400&gt; 7

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe  
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp  
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala  
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala  
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr

65	70	75	80
Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln	85	90	95
Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His	100	105	110
Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe	115	120	125
Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu	130	135	140
Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu	145	150	155
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala	165	170	175
Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln	180	185	190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg	195	200	205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu	210	215	220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr	225	230	235
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu	245	250	255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu	260	265	270

Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val  
 275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu  
 290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His  
 305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile  
 325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys  
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp  
 355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val  
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp  
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu  
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile  
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg  
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val  
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln  
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile  
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro  
 500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile  
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn  
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu  
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys  
 565 570 575

<210> 8

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe  
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp  
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala  
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala  
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr  
 65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln  
 85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His  
 100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe  
 115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu  
 130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu  
 145 150 155 160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala  
 165 170 175

Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln  
 180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg  
 195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu  
 210 215 220

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr  
 225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu  
 245 250 255

Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu  
 260 265 270



Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val  
 275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu  
 290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His  
 305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile  
 325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys  
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp  
 355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val  
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp  
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu  
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile  
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg  
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val  
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln  
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile  
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro  
 500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile  
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn  
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu  
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys  
 565 570 575

<210> 9

<211> 383

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus.

<400> 9

gttaactggg gctcttttaa accctgaatt ttcttaaate cccacctcca agagtttggt 60

ttaaactgat ttttttaatg aatacctttt gaagaataga gcattgtctc atcatgcaaa 120

gcttctcagg gattcagcta gcatgttgaa gaaacataag ggtgttaaat tgtttgtcac 180

aagtgtgaa taaatattga cgtagtcttc agctattcta tactggaagt agatgatatt 240

ctcattggaa attctgttag gaagtaaccc ttcttgtctt cttacctgca tagaatccca 300

ggatataaaa cttgtgcttg tgcgccttgc cattgtctct cactggtggc ctttattgca 360

tctcatatct gccttctctt tcc 383

<210> 10

<211> 504

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 10

taagaattcc tgtgcccagc tgtatgtgag gctctctgca ggtgtaggga tgtttctgct 60

ttctttctgc acatgcttca cagctgaagt cctttgggtg tgagattgac attcagatag 120

actaaagtga ctggacttgt tgggaaacat actgtatgca ttattgccgt tgcctccagg 180

tgaaattaac acctcattca ccaatccctg ttcattccaaa ctttctaccc acatcacttt 240

aaatagaaat tagaccaat atgactcctt ttttctaag ctgtttatag agattgtgct 300

ggagcagtga gcttttgtgt ttgtttgttt gttttgtaat tttcccatg aaaatttctc 360

taaactcaaa cctaagaggg aaaaaaaaaa aacagactta tatgtgccac acttgtaaaa 420

aaaaatcatg aaagatgtat atgatatttt taaacagttt gaatattaag atcacaattt 480

ctatttttaa aacaatcttg ttttacatat caatcaccca attcccttgc cttcccatcc 540

tcccattecc cccactgatc cccc 564

<210> 11

<211> 120

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 11

atgaatgttc attctttggg tatatgccca agagtagaat tgctaaatat tgaggtagac 60  
tgattcccat tttcttgagg agtcgccata ttgatttcca aagtgactgt acaagttaac 120

<210> 12  
<211> 274  
<212> DNA  
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 12  
aggcactagg taaatatttt tgaagaaaga atgagtatct cctatttcag aaaaactttt 60  
attgacttaa atttaggata tcagaattag aaaacagtaa aaatttatag gagagttttt 120  
aatgaatggt attttaagg tccatacaaa tagtaattaa aacttacaca aactatttgt 180  
agtaatgatt cagtctggt taccctgatg agcattatac acttttaaatt tctttttgta 240  
aattttttta ttagttcaaa ttaggaacaa gctt 274

<210> 13  
<211> 9196  
<212> DNA  
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 13  
tctagaccag gctggtctcg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgtg 60  
ggattaaagg tgtgcaccac caccgccgg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120  
atttacatta taattgtaag taaaaatttt cagcctatct tgttatacat ttttgcgtaa 180  
attattcttt ttgaaagtt ttgttgtcca taatagtcta gggaaacata aagttataat 240  
ttttgtctat gtatttgcac atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300

ggtatgtaat agcttcaaca tgtggtatga tagaattttt cagtgtata taagttgtta 360  
cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420  
atccttaage tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480  
ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540  
ggtccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600  
gatgagtctt gtgaccttag tttcttttaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660  
ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720  
tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgtcctt 780  
atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840  
aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900  
cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960  
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020  
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080  
agtagacaag acattaaata ttccttgga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140  
atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatatttttag cagaaatcag aataaatggg 1200  
gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttctttg ggtttttgtg catttaaagt 1260  
caataaaaaat taaggttcag taatagaaaa aaactctga ttttggaat cccctttctt 1320  
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa ttttaatttg ggccatgtgg tcaaagtata 1380  
tagccttgta tatgtaaag ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440

tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500  
tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560  
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa tttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620  
tttaaataac atagccaccc taagggttta actgttggtta gccttctttt ggaattttta 1680  
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740  
tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatggtct 1800  
ggtttgatcc atttgaacct ttgatgttt ggtgtggttg ccaattgggt gatggttatg 1860  
ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920  
gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980  
ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040  
tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100  
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160  
aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220  
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280  
ctatatctca aacaactcag ggtgtttcct actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340  
gcacaggaca agaaagctgc ctccttgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcac 2400  
acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460  
atttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520  
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttgat 2580

tatgctcatt ctttttgcct gggggacctt attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640  
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700  
gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760  
aaataactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgaccttt aggtataggg tctcagtctg 2820  
ctgttgaaaa atataatttc tacaaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880  
tttttaaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg ttacatagt tgcaatctta 2940  
ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000  
attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatTTTTTT 3060  
attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120  
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgca tccggaatgt gggttaattat 3180  
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagttgtttg 3240  
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300  
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360  
tctaagaatg atcatgtgta cagtgcttac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420  
tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtggtatta 3480  
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540  
tagagaggat gccttctggc tctcccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600  
cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660  
aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720

tcctcgggtgt gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780  
agtcaggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840  
cagggagggt tatgaaagtt gtggcttttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900  
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaat 3960  
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtag 4020  
tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080  
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140  
tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaattttatt 4200  
taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc tttcccttt tataatttag 4260  
gtcctgaat aatcactgaa tttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320  
tccttttttc ttaccacaaa gtatcttggt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380  
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440  
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggtcttta ttggctagct 4500  
ctgtcttaat tattaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560  
caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtga gagagagag 4620  
cgatttccta tttgtctctg cttattttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680  
ggccaatcag ccaatcagt ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740  
gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800  
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860



ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaaatca gatctttttt taagggacaa 4920  
agagtttatt cagattacat ttttaaggatga taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980  
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040  
gatgcatgca ttcctgtgct cagctcactt ttcctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100  
tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160  
catctctcca gtccctcata tggctcttta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220  
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaagc tgatataata 5280  
aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340  
gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400  
tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttattt taaagctaag acatgaatga 5460  
tggacatgct tgtagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatttttgt 5520  
gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtatattc tttgtgataa 5580  
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640  
caataatttt caaaagcagt tacccaactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700  
gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctattttactc ttgatttttt 5760  
tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtta tggctgcaaa catctttgac 5820  
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttggcca aaatcttggt ccattctggg 5880  
tttcttctct atctaggtag ctagcacaag tttaaagggtgt ggtagtattg gaaggctctc 5940  
aggtatatat ttctatatte tgtatttttt tcctctgtca tatatttgct ttctgtttta 6000

ttgatttcta ctgtagttt gatacttact ttcttacact ttctttggga tttattttgc 6060  
tggtctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120  
atagactgaa tgccccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180  
ttttttaata tttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240  
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaaa ttaatttgtg 6300  
ttctatattt ttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360  
atttttttgt ttgatctgtt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420  
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480  
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540  
tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaactt tatatagcat 6600  
gttgtttgtt aggtagtga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaa 6660  
atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgetgtct cctatcggtt 6720  
ctggttttcc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780  
cttgttttct gtgaattaac cctttttcaa aggtttcttt tctttttttt ttaaggagac 6840  
aacaagtta ttcagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900  
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960  
tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020  
tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatatc cacttacttc agttcatgca 7080  
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140

ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gceatcacta 7200  
gtaaatataa tgaaaatggt gattatcacc ataattcacc tgtatccctt tgttattgta 7260  
gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttccttcctt aaaaacctgt tttttagtta 7320  
aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380  
gtatgttctc ccagtctttg gcttgatatt tcaccccttc aatacatata tttttgtaat 7440  
ttattttttt tatttaaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500  
tccctccctt cctccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560  
aggaagggtg aggcctcca tgggggaaat ctccaatgtc tgcataatca tttggagcag 7620  
ggcctagacc ctccccagt tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggt 7680  
cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740  
tgtccggacc tccaaactga ctctctcctt caggaggtct ggaacagttc tatgctgggt 7800  
tcccagatat cagctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gtttctgtag 7860  
gtttccccag cccggtcttg accccttgc tcatacttc tccctctctg caactggatt 7920  
ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcac tgcttccac agctactgga 7980  
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagttc attatcagag aagggtttt 8040  
aaggtagcct ctgattatt gcttagattg ttagttggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100  
acagtacag aattctcttt aaacctataa tggtccctc tgtggtggta tcccttttct 8160  
tgctctcac cgctctccc ctgactagat ctctctctc cctcatgtcc tctctcccc 8220  
tcccttctc ccttctctt tcttctaact cctctcccc tccaccacg atccccatta 8280

gcttatgaga tcttgtcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340  
aatatgctta tatcaggttt attttgcta gtatttgtat gtgtttgggt agtgttttta 8400  
accttaattg acatgtatcc ttatatitag acacagattt aaatatttga agtttttttt 8460  
tttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagaggg 8520  
caccagatct cattcaagggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580  
gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640  
gtttctttta aagaggatag cagtgcata tttttccctt tgaccaatga ctcctacctt 8700  
actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttaccà ggtttacatt ttctttttatc 8760  
ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcacc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820  
ttttattttt ctgtttttac agtaagttat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880  
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcaccat gtgctgacct ggtcttggcc agaagaagggt 8940  
gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000  
aaaccccagc tctcttgga aagcagccac tgctctgagc cactgagtc tctcttcaag 9060  
caggatgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgatc tctagcacc 9120  
atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180  
aggatcccaa gagctc 9196

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

&lt;400&gt; 14

Asn Tyr Asn Met Asp

1

5

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 15

Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Ser

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 16

Thr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr

1

5

10

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 17

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1

5

10

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 18

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1

5

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 19

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr

1

5

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 20

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 22

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Heavy Chain Variable Region

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Ser Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125



&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Heavy Chain Variable Region

&lt;400&gt; 23

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Light Chain Variable Region

&lt;400&gt; 24

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 100 105

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Light Chain Variable Region

&lt;400&gt; 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
100 105

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Heavy  
Chain Variable Region

&lt;400&gt; 26

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20	25	30
Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe		
50	55	60
Lys Ser Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
115	120	125

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Heavy Chain Variable Region

&lt;400&gt; 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1                      5                      10                      15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20                      25                      30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met

35                                      40                                      45  
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe  
     50                                      55                                      60  
 Lys Ser Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
     65                                      70                                      75                                      80  
 Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                     85                                      90                                      95  
 Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
                                     100                                      105                                      110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
                                     115                                      120                                      125

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Heavy Chain Variable Region

&lt;400&gt; 28

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
     1                                      5                                      10                                      15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                                     20                                      25                                      30  
 Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                                     35                                      40                                      45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

40/47

85 90 95  
 Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Light Chain Variable Region

<400> 31

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr



100

105

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Light Chain Variable Region

&lt;400&gt; 32

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
100 105

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Light Chain Variable Region

<400> 33

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
100 105

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Light Chain Variable Region

&lt;400&gt; 34

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 100 105

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Antibody Light  
 Chain Variable Region

&lt;400&gt; 35

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                   20                                  25                                  30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
                   35                                  40                                  45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
                   50                                  55                                  60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu  
                   65                                  70                                  75                                  80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
                                   85                                  90                                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
                   100                                  105

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

gagacttcag cccacttcaa ttattggc

28

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

cttgtgtgac tcttaactct cagag

25

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38

gaggccactt gtgtagcgcc aagtg

25

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

ccctcgagat aacttcgtat agc

23

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 40

ggtaggcctc actaactg

18

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 41

catagaaaca agtaacaaca gccag

25

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

gtgagtcacat ggctgtcact g

21

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43

cctgacttgg ctattctcag

20

PCT

原本(出願用)

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、右記によって作成された。	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.163)
0-2	国際出願番号	PCT/JP2004/015317
0-3	出願人又は代理人の書類記号	1622

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	26
1-2	行	18
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6
1-3-3	寄託の日付	2003年 09月 09日 (09.09.2003)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08470
1-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28 (4) EPC)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

## 受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	08.10.2004
0-4-1	権限のある職員	大橋朝子

## 国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	28.10.2004
0-5-1	権限のある職員	藤野みどり

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015317

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/18, C12N15/13, C12N5/10, C12P21/08, A61K39/395,  
A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/18, C12N15/13, C12N5/10, C12P21/08, A61K39/395,  
A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/31140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), & AU 200194198 A & US 2003/0115614 A1 & EP 1331266 A1 & BR 200114475 A & KR 2003081312 A & MX 2003002974 A1	1-48
Y	JP 10-257893 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 29 September, 1998 (29.09.98), & AU 9859420 A & EP 882794 A2 & CA 2226400 A & DE 69824234 E & ES 2219802 T3	1-48

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 January, 2005 (12.01.05)

Date of mailing of the international search report  
01 February, 2005 (01.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015317

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	YAMANE-OHNUKI, N. et al., Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. Biotechnol.Bioeng. 05 September, 2004 (05.09.04), Vol.87, No.5, pages 614 to 622	1-48
P,X	WO 03/85107 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 October, 2003 (16.10.03), & AU 2003236022 A1 & US 2004/0110704 A1	1-48
P,X	WO 03/85118 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 October, 2003 (16.10.03), & AU 2003236015 A1 & US 2004/0132140 A1	1-48

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/18, C12N 15/13, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/18, C12N 15/13, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 02/31140 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2002. 04. 18 & AU 200194198 A & US 2003/0115614 A1 & EP 1331266 A1 & BR 200114475 A & KR 2003081312 A & MX 2003002974 A1	1-48
Y	JP 10-257893 A (協和醗酵工業株式会社) 1998. 09. 29 & AU 9859420 A & EP 882794 A2 & CA 2226400 A & DE 69824234 E & ES 2219802 T3	1-48

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 01. 2005

国際調査報告の発送日

01. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9 2 8 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	YAMANE-OHNUKI, N. et al. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. Biotechnol. Bioeng. 2004. Sep. 5, Vol. 87, No. 5, p. 614-622	1-48
P, X	WO 03/85107 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003.10.16 & AU 2003236022 A1 & US 2004/0110704 A1	1-48
P, X	WO 03/85118 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003.10.16 & AU 2003236015 A1 & US 2004/0132140 A1	1-48